
SZTEROID TÍPUSÚ VEGYÜLETEKKEL KIVÁLTOTT CITOKRÓM P450 INDUKCIÓ VIZSGÁLATA HUMÁN MÁJSEJTEKBEN

Doktori értekezés

Kőhalmy Krisztina
okleveles vegyész

ELTE TTK, Biológia Doktori Iskola
Szerkezeti Biokémia Program

Doktori Iskola vezető: Prof. Dr. Erdei Anna
Programvezető: Prof. Dr. Gráf László



Témavezető: Dr. Monostory Katalin Ph.D.
csoportvezető

Magyar Tudományos Akadémia
Kémiai Kutatóközpont



Budapest, 2009

Rövidítésjegyzék

AhR:	aromás szénhidrogén receptor
AhRR:	AhR represszor
ARNT:	AhR nukleáris transzlokátor
bHLH:	basic helix-loop-helix
CAR:	konstitutív androsztán receptor
CBP:	cAMP response element-binding protein
CITCO:	6-(4-klórfenil)imidazo[2,1- <i>b</i>][1,3]tiazol-5-karbaldehyd-O-(3,4-diklórbenzil)oxim
COUP-TF:	chicken ovalbumin upstream promoter faktor
DBD:	DNS-kötő domén
DHEA:	dehidroepiandroszteron
DR:	direct repeat
DRIP:	vitamin-D receptor interacting protein
ER:	everted repeat
GR:	glükokortikoid receptor
GRE:	glükokortikoid érzékeny szakasz
IR:	inverted repeat
LBD:	ligandkötő domén
NCoR:	nukleáris korepresszor
P450:	citokróm P450
PAH:	policiklusos aromás szénhidrogén
PAS:	Per-Arnt-Sim
PBREM:	fenobarbitál érzékeny szakasz
PBRU:	phenobarbital responsive enhancer unit
PPAR α :	peroxiszóma proliferátor aktiválta receptor
PXR:	pregnán X receptor
PXRE:	PXR érzékeny szakasz
RU-486:	mifepristone
RXR:	retinoid X receptor
SMRT:	silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor
SR12813:	tetraetil 2-(3,5-di-tercbutil-4-hidroxifenil)eténil-1,1-biszfoszfónát
SRC-1:	sztteroid hormon receptor koaktivátor-1

TAD: transcription activation function

TCDD: 2,3,7,8-tetraklórbenzo-p-dioxin

TCPOBOP: 3,3',5,5'-tetraklór-1,4-bis(piridiloxi)benzol

TIF2: transcription intermediary factor 2

TRAP: thyroid receptor associated protein

XRE: xenobiotikum érzékeny szakasz

VDR: D-vitamin receptor

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés	5
2	Irodalmi összefoglalás	6
2.1	Xenobiotikumok metabolizmusa	6
2.2	A P450 enzimek jellemzése	7
2.2.1	Humán P450 enzimek	10
2.3	P450 enzimek indukciója	12
2.3.1	CYP1A1 gén szabályzás	20
2.3.2	CYP2B6 gén szabályzás	22
2.3.3	CYP3A4 gén szabályzás	24
2.3.4	CYP2C gének szabályzása	26
2.4	DHEA szerepe az emberi szervezetben	27
2.5	Dexametazon hatása és alkalmazása	35
3	Célkitűzések	38
4	Anyagok és módszerek	39
4.1	Vegyszerek	39
4.2	Primer májsejtek izolálása és fenntartása	39
4.3	P450 specifikus enzimaktivitás mérések	42
4.4	Western blot analízis	47
4.5	RNS izolálás	47
4.6	Northern blot analízis	48
4.7	Kvantitatív RT-PCR	48
4.8	Tranziens transzfektálás	49
4.9	Nukleáris transzlokációs vizsgálatok	50
4.10	Kiértékelés és statisztikai elemzés	51
5	Eredmények	52
5.1	CYP1A indukció patkány májsejtekben	52
5.2	CYP1A1 expresszió humán májsejtekben	54
5.3	Egyéb, glükokortikoid típusú vegyületek hatása a CYP1A indukciójára	59
5.4	DHEA-nal kiváltott P450 indukció humán májsejtekben	61
5.5	Humán PXR aktiválása DHEA-nal	64
5.6	CAR szerepe a Cyp2b10 indukciójában	65
5.6.1	DHEA hatására bekövetkező Cyp2b10 indukció vad típusú és CAR knockout egerekből izolált májsejtekben	65
5.6.2	Androsztanol hatása a DHEA-nal kiváltott Cyp2b10 indukciójára egér májsejtekben	67
5.6.3	Humán CAR transzlokációja a citoplazmából a sejtmagba, DHEA kezelést követően	67
6	Eredmények értékelése	70
6.1	Dexametazon hatása a CYP1A1 indukcióra	70
6.2	DHEA-nal kiváltott P450 indukció humán májsejtekben	72
7	Következtetések	75
7.1	Dexametazon hatása a 3-metilkolantrénnel kiváltott CYP1A1 indukcióra	75
7.2	DHEA-nal kiváltott P450 indukció humán májsejtekben	76
8	Összefoglalás	77
9	Summary	78
10	Irodalomjegyzék	80

1 Bevezetés

A szervezetbe kerülő xenobiotikumok (gyógyszerek, növényvédőszer, élelmiszer adalékanyagok, egyéb kémiai anyagok) metabolizmusában a citokróm P450 (P450) enzimrendszernek kulcsfontosságú szerepe van. A P450 enzimek legnagyobb mennyiségben a májban expresszálódnak. A máj gyógyszer-metabolizáló képességét elsősorban a P450 enzimek mennyisége és aktivitása határozza meg, amely nagyban befolyásolhatja egy adott gyógyszer hatékonyságát és esetleges toxicitását. Az aktuális P450 enzimszint genetikailag meghatározott, melyet azonban külső és belső tényezők módosíthatnak (dohányzás, alkohol fogyasztás, környezeti ártalmak, betegségek, gyógyszeres kezelés). Számos gyógyszer (rifampicin, dexametazon, fenobarbitál, omeprazol) receptorfüggő mechanizmussal fokozni képes a P450 gén transzkripcióját, melynek hatására nő az adott P450 enzimfehérje mennyisége a sejtekben. Ennek az enzimindukciós hatásnak, mely befolyásolja a szervezetbe kerülő xenobiotikumok metabolizmusát, igen nagy jelentősége van egy gyógyszeres kezelés során, hiszen számolnunk kell a fellépő metabolikus gyógyszer-interakciók lehetőségével, melynek következtében szükséges lehet a terápia módosítása.

A hormonális állapot természetes változásai, valamint a terápiában alkalmazott szteroid típusú vegyületek is jelentős változásokat okozhatnak a P450 expresszióban és a P450 enzimfehérje szintekben. A szteroid típusú anyagok hatásának vizsgálata, valamint a gyógyszer-metabolizmusban résztvevő enzimek és a hormonális szabályzás közti kapcsolódási pontok feltérképezése magyarázatot adhat például a daganatos megbetegedések során, vagy a mellékvese működés zavarai következtében tapasztalható eltérő gyógyszer hatékonyságra és toxicitásra. Vizsgálataink során egy szintetikus glükokortikoid, a dexametazon, valamint a mellékvesekéregben termelődő szteroid típusú hormon, a dehidroepiandrosteron (DHEA) hatását tanulmányoztuk a humán P450 gén expressziójára.

2 Irodalmi összefoglalás

2.1 Xenobiotikumok metabolizmusa

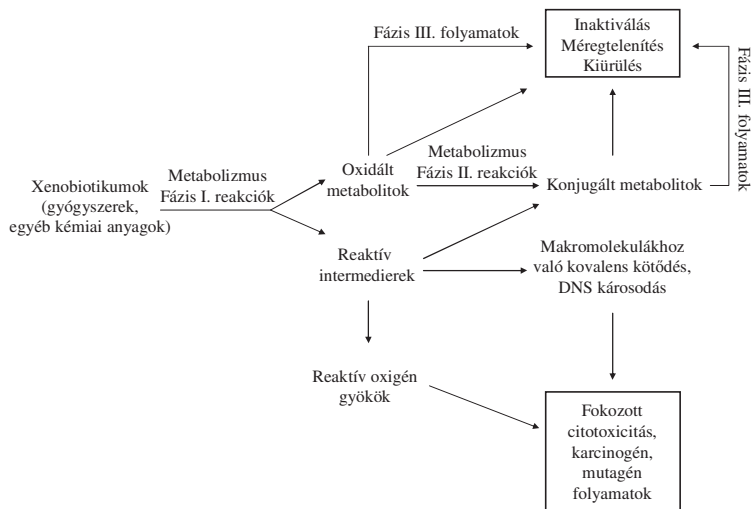
A szervezetbe kerülő testidegen anyagok (xenobiotikumok), például gyógyszerek, növényvédőszer, és különböző élelmiszeradalékanyagok, többnyire apoláris vegyületek, lipofil jellegüknel fogva könnyedén átjuthatnak a sejtmembránokon. Az élő szervezetekben a xenobiotikumok eliminálását elősegítendő, két alapvető védekezési mechanizmus fejlődött ki az evolúció során: a biotranszformáció és a transzport folyamatok (Handschin és Meyer, 2003).

A xenobiotikumokból a biotranszformáció (metabolizmus) során többnyire hidrofí, poláris metabolitok képződnek, melyek az epével és/vagy a vizelettel választódnak ki. A metabolizmus folyamata két fázisra tagolódik (fázis I., fázis II.) (1. ábra). A gyógyszerek metabolizmusában elsősorban a monooxigenázok csoportjába tartozó aspecifikus enzimrendszer, a P450 enzimcsalád vesz részt (Nelson és mtai, 1996; Nebert és Russell, 2002). Igen változatos kémiai reakciókat katalizálnak, általában oxidálják a vegyületeket (például alifás és aromás hidroxilezés, N-, O-, S-dezalkilezés, gyűrűzárás, gyűrűhasítás), azonban ritkán redukció is előfordulhat. Ezeket a reakciókat a metabolizmus fázis I. reakcióinak nevezzük (Ziegler, 1994). A fázis I. metabolizmusban egyéb enzimek is részt vesznek, például az epoxid hidrolázok, észterázok, alkohol és aldehid dehidrogenázok és a flavinmonooxigenázok.

Az úgynevezett fázis II. metabolizmus során a xenobiotikumok, valamint a fázis I. reakciók során képződött metabolitok különböző endogén vegyületekkel konjugálódhatnak, ami általában növeli az adott vegyület polaritását illetve vízben való oldékonyságát, elősegítve ezzel a kiürülését (Jakoby, 1994). A legfontosabb konjugációs enzimek az UDP-glükuroniltranszferázok, N-acetiltranszferázok, glutation-S-transzferázok, metiltranszferázok és a szulfotranszferázok.

A metabolizmus során többnyire méregtelenítés, a bekerülő testidegen anyagok inaktiválása történik (farmakológiai inaktív metabolitok képződése), azonban reaktív intermedierek és reaktív oxigén gyökök is képződhetnek, melyek makromolekulákhoz való kovalens kötődéssel DNS károsodást, fokozott citotoxicitást idéznek elő. A prekarcinogének aktiválásában, illetve a carcinogén és mutagén folyamatokban a P450 enzimeknek szintén jelentős szerepe van (Nebert és Gonzalez, 1987) (1. ábra).

Az elimináció folyamatában részt vesznek továbbá a transzporterek, melyek transzmembrán fehérjék és kémiai szerkezetüket tekintve a legkülönbözőbb anyagok (például lipidek, szteroid típusú vegyületek, polipeptidek, ionok, gyógyszerek, metabolitok) szállítását végzik az extra- és intracelluláris membránokon keresztül (fázis III. folyamatok) (Stieger és Meier, 1998; Muller, 2000; Suzuki és Sugiyama, 2000; Bohan és Boyer, 2002).

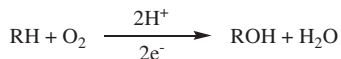


1. ábra: Xenobiotikumok sorsa a szervezetben

2.2 A P450 enzimek jellemzése

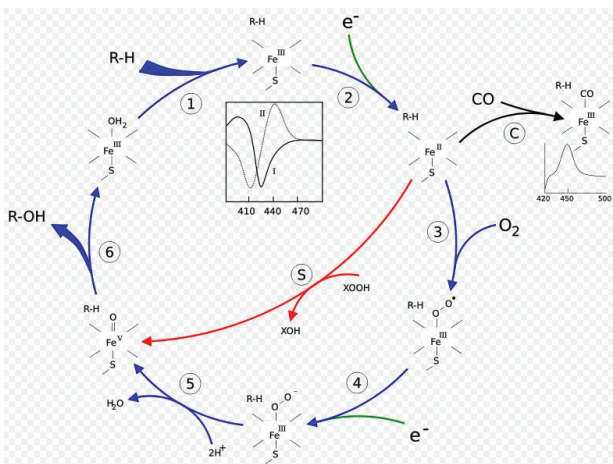
A P450 enzimek a prokarióta és eukarióta szervezetekben egyaránt megtalálhatóak (Schenkman és Griem, 1993; Pinot és mtsai, 1999; Gorman és mtsai, 1998; Nelson, 1998). Hem-tiolát típusú enzimek, a redukált P450 szén-monoxiddal alkotott komplexe 450 nm-nél jellegzetes abszorpciós maximumot mutat (Soret-abszorpciós maximum), erről a jellegzetes tulajdonságáról kapta az enzimrendszer a nevét (Garfinkel, 1958; Klingenberg, 1958; Frausto da Silva és Williams, 1991). Működésükhöz szükség van NADH-ra vagy NADPH-ra, mely az adott P450 enzim típusától függ, molekuláris oxigénre és az úgynevezett NADPH-citokróm-P450 reduktázra (Lewis és Hlavica, 2000; Degtyarenko és

Archakov, 1993). A P450 enzimek a monooxygenázok csoportjába tartoznak, a molekuláris oxigénből származó egyik oxigénatomot a szubsztrátba építik be, eközben a másik oxigénatom vízkilépéssel távozik (Okita és Masters, 1992; Porter és Coon, 1991; Ortiz de Montenallos, 1995). A folyamathoz szükséges elektronokat a NADPH-citokróm-P450 reduktáz és a citokróm *b₅* szállítja. A P450 katalizált folyamat a következő bruttó egyenlettel írható le:



ahol RH a szerves szubsztrát és ROH az oxidált termék (metabolit).

A 2. ábrán részletesen látható a szubsztrát (RH) oxidációja valamint a hem vas ionjának aktuális redox állapotai az egyes lépésekben (Otsuka, 1970; Lewis, 1996).



2. ábra: P450 katalitikus ciklus (Otsuka, 1970; Lewis, 1996)

Igen népes enzimsaládról van szó (1. táblázat), jelenleg körülbelül 8000 P450 izoenzim ismert, az emberi szervezetben 57 P450 gén, valamint 58 pszeudogén van jelen (<http://drnelson.utmem.edu/cytochromeP450.html>). Emlősökben legnagyobb mennyiségben a máj sima felszínű endoplazmás retikulumában expresszálódnak, de kisebb mennyiségben megtalálhatók más szervekben is, így például a vesében, a mellékvesében, az agyban, a tüdőben, a lépben és a bélben is (Williams és mtsai., 2000; Waterman, 1992; Schenkman és Griem, 1993; Hellmold és mtsai., 1998; Hakkola és mtsai., 1996, 1998).

1. táblázat: A P450 enzimcsalád nomenklatúrájának összefoglaló táblázata
(A félkövér betűkkel kiemelt enzimcsaládok jelzik az emlősökben expresszáldó formákat)

Enzimcsalád	Funkció vagy előfordulás	Legfontosabb humán P450 enzimek
CYP1	xenobiotikum és szteroid metabolizmus	CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1
CYP2	xenobiotikum és szteroid metabolizmus	CYP2A6, CYP2A7, CYP2A13, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2F1, CYP2J2, CYP2R1, CYP2S1, CYP2U1, CYP2W1
CYP3	xenobiotikum és szteroid metabolizmus	CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43
CYP4	arachidonsav és zsírsav metabolizmus	CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4V2, CYP4X1, CYP4Z1
CYP5	tromboxán A ₂ szintézis	CYP5A1
CYP6	rovarokban	
CYP7	epesav bioszintézis	CYP7A1, CYP7B1
CYP8	prosztaciklin és epesav bioszintézis	CYP8A1, CYP8B1
CYP9	rovarokban	
CYP10	puhatestűekben	
CYP11	szteroid bioszintézis	CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2
CYP17	szteroid bioszintézis	CYP17A1
CYP19	szteroid bioszintézis	CYP19A1
CYP20	ismeretlen funkció	CYP20A1
CYP21	szteroid bioszintézis	CYP21A2
CYP24	D ₃ -vitamin metabolizmus	CYP24A1
CYP26	retinoid metabolizmus	CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1
CYP27	epesav bioszintézis	CYP27A1, CYP27B1, CYP27C1
CYP39	epesav bioszintézis	CYP39A1
CYP46	oxisztatol bioszintézis	CYP46A1
CYP51	koleszterin bioszintézis	CYP51A1
CYP51-70	gombákban	
CYP71-100	növényekben	
CYP101-140	baktériumokban	

Az enzimrendszert alkotó enzimek rendszerbe sorolása az aminosav sorrendjük homológiáján alapszik. Minden enzim neve sorrendben a CYP rövidítésből, egy arab számból, egy betűből és még egy arab számból áll. Az első arab szám az enzimcsaládot (azonos enzimcsaládba tartozás esetén 40 %-os aminosav sorrend azonosság), a betű az alcsaládot (azonos alcshaládba tartozás esetén 55 %-os aminosav sorrend azonosság), a második arab szám pedig egy konkrét enzimfehérjét jelöl (például CYP2B6).

2.2.1 Humán P450 enzimek

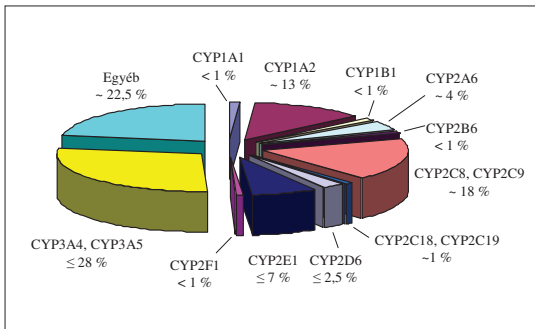
A gyógyszereszek metabolizmusában (CYP1-3 családok, ld. 1. táblázat) betöltött szerepük ismerete óta a humán P450 enzimek tanulmányozása előtérbe került. A P450-ekre gyakorolt hatásvizsgálatok nélkül manapság egy gyógyszerjelölt fejlesztése elképzelhetetlen. Ismert, hogy a xenobiotikumok biotranszformációjában faji eltérések lehetségesek (Guengerich, 1997). Egy adott vegyület metabolizmusának jellemzők sokszor nehézségbe ütközik az *in vitro* vagy *in vivo* állatkísérletekből származó eredmények emberre történő kiterjesztése (Lewis, 1998). Ezen kívül figyelembe kell venni azt is, hogy a P450-ek indukálhatósága is, fajonként különbözhet (Lewis, 1998; Soucek és Gut, 1992).

A P450 enzimeknek a xenobiotikumokon kívül, endogén szubsztrátjaik is ismertek, ilyenek például a szteroidok, zsírsavak, prosztaglandinok, leukotriének, biogén aminok, D₃-vitamin stb. (1. táblázat) (Lewis, 1996; Kupfer, 1980; Lewis és Lee-Robichaud, 1998). Igen nagy szerepük van a koleszterinből kiinduló, *de novo* szteroid hormon (CYP11, 17, 19, 21), valamint epesav bioszintézis (CYP7, 8, 27, 39, 51) folyamataiban. Aspecifikus enzimekről van szó, kémiai szerkezetüket tekintve a legkülönbözőbb vegyületeket képesek szubsztrátként (2. táblázat) elfogadni és metabolizálni valamint egy adott P450 enzim egy vegyületből több metabolitot is képes előállítani és végül egy vegyület metabolizmusát több különböző P450 enzim is katalizálhatja egyidejűleg (Groves, 1997; Porter és Coon, 1991; Juchau, 1990).

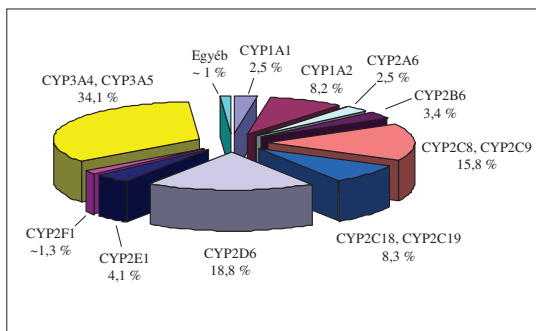
2. táblázat: Xenobiotikumok metabolizmusában résztvevő fontosabb P450 enzimek néhány jellegzetes szubsztrátja, induktora és gátlószere (rövidítés: TCDD: 2,3,7,8-tetraklór-dibenzo-p-dioxin)

P450 enzim	Szubsztrátok	Induktorok	Gátlószerek
CYP1A2	koffein, teofillin, fenacetin	cigarettafüst komponensei, omeprazol, TCDD, 3-metilkolantrén	flavonoidok
CYP2A6	nikotin, kumarin	fenobarbitál, dexametazon, rifampicin	tranilcipromin, metoxipsoralen
CYP2B6	ciklofoszfamid, mefenitoin	fenobarbitál, dexametazon, rifampicin	orfenadrin, pentoxirezorufin
CYP2C8	karbamazepin, taxol	fenobarbitál, dexametazon, rifampicin	kvercetin
CYP2C9	tolbutamid, diklofenac, tetrahidrokannabinol	fenobarbitál, dexametazon, rifampicin	szulfafenazol
CYP2C19	mefenitoin, diazepam	fenobarbitál, dexametazon, rifampicin	tranilcipromin
CYP2D6	dextrometorfán	nem indukálható	kinidin, fluoxetin
CYP2E1	klórzoxazon, oldószerek	etanol, izoniazid	diszulfiram, dietil-ditiokarbamát
CYP3A4/5	nifedipin, midazolam, eritromicin	fenobarbitál, dexametazon, rifampicin	ketokonazol, troleandomicin

A metabolizmus szempontjából legfontosabb enzimek: CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2F1 és CYP3A4/5. Érdemes megjegyeznünk, hogy a gyógyszerek metabolizmusában résztvevő legfontosabb P450 enzimek százalékos megoszlása a májban, valamint a gyógyszerek metabolizmusában való részvétele eltérő (3. és 4. ábra, Rendic és DiCarlo, 1997).



3. ábra: A gyógyszer-metabolizmusban résztvevő P450 enzimek százalékos megoszlása a májban (forrás: Rendic és DiCarlo, 1997)



4. ábra: A P450 enzimek gyógyszer-metabolizmusban betöltött szerepének százalékos aránya (forrás: Rendic és DiCarlo, 1997)

2.3 P450 enzimek indukciója

A P450 gének szabályozása igen sokszintű, több folyamatból tevődik össze, számos tényező befolyásolja. Különböző endogén anyagok, úgy mint hormonok, citokinek, valamint kémiai szerkezetüket tekintve igen változatos testidegen vegyületek hatására a P450 gén transzkripció fokozódik, mely végül emelkedett P450 fehérje szinteket eredményez (Waxman, 1999). Az úgynevezett P450 indukciós válasz gyógyszerinterakciók forrása, amely befolyásolja a P450-függő gyógyszer-metabolizmust, valamint a xenobiotikumok farmakokinetikai, toxikológiai és karcinogén tulajdonságait

(Conney, 1982). A megemelkedett P450 enzimszintek következtében felmerülő leggyakoribb probléma egy gyógyszeres kezelés során, hogy egy adott gyógyszer fokozott metabolizmusa miatt a vérszintje nem éri el a terápiás vérkoncentrációt. Ilyen esetekben az adott gyógyszer terápiás dózisát módosítani kell és a vérszint monitorozása segíthet a megfelelő dózis beállításában.

Az induktor vegyületek (3. táblázat) hatása nemcsak a P450-ek gén-szintű szabályozására korlátozódik, hanem pleiotróp hatásuknál fogva (például fenobarbitál), többek között befolyásolják a glükóz és szteroid metabolizmust, a koleszterin és epesav bioszintézist, a hem szintézist, a sejtnövekedést, a sejtek közötti kommunikációt, a sima felszíni endoplazmás retikulum proliferációját, valamint elősegíthetik a tumorok kialakulását (Nebert, 1991; Okey, 1990). Az indukció általában késleltett hatású, sejtspecifitást mutat, dózis-függő és az induktor vegyület eliminációjával az indukciós hatás is megszűnik (Handschin és Meyer, 2003). A P450 induktor vegyületek csoportosíthatók aszerint, hogy mely P450 enzimeket indukálják (3. táblázat). Külön kiemelendő, hogy a fenobarbitál-típusú és a rifampicin/dexametazon-típusú induktorok ugyanazokra a P450-ekre fejtik ki hatásukat, azonban eltérő relatív erősséggel. A fenobarbitál a CYP2B-t, míg a rifampicin és a dexametazon a CYP3A-t indukálja leghatékonyabban, azonban emellett megfigyelhető mindkét induktor prototípusnál a többi P450 kisebb mértékű indukciója is (3. táblázat). Az etanol induktív hatását a CYP2E1-re, eltérő módon a többi induktor vegyülettől, nem receptorfüggő mechanizmussal (ld. később), hanem poszttranszlációs szinten, az enzim stabilitásának növelésével fejtik ki (Gonzalez és mtsai., 1991; Lieber, 1997).

3. táblázat: Klasszikus P450 induktor vegyületek csoportosítása (Handschin és Meyer, 2003). Rövidítések:

PAH: policiklusos aromás szénhidrogén, TCDD: 2,3,7,8-tetraklórdibenzo-p-dioxin

Klasszikus P450 induktorok prototípusai	Indukált P450-ek
TCDD (egyéb PAH-vegyületek)	CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1
fenobarbitál	CYP2B, CYP2C, CYP3A
rifampicin, dexametazon	CYP3A, CYP2C, CYP2B
etanol, izoniazid	CYP2E1
klofibrátok	CYP4A

A CYP1-4 gének xenobiotikumok hatására bekövetkező transzaktiválása (transzkripció szintjén történő aktiválása), mely a P450 célgének indukcióját okozza, receptorfüggő mechanizmust mutat. Az indukció mechanizmusában résztvevő receptorok közül (4. táblázat), a konstitutív androsztán receptor (CAR), a pregnán X receptor (PXR), a peroxizóma proliferátor aktivált receptor α (PPAR α), a D-vitamin receptor (VDR), és a

glükokortikoid receptor (GR) a nukleáris/sejtmag receptorok szupercsaládjába tartoznak, míg az aromás szénhidrogén receptor (AhR), a transzkripció faktorok hélix-loop-hélix (bHLH) struktúrával rendelkező PAS (Per-Arnt-Sim) családjának tagja (Hankinson, 1995).

A nukleáris receptoroknak DNS-hez kötődő transzkripció faktorokként számos biológiai folyamat szabályzásában (növekedés, fejlődés, hormon homeosztázis fenntartása) kulcsszerepe van. A legkülönbézetőbb mechanizmusokkal képesek célgénjeik transzkripcióját modulálni, úgy mint gén aktiválással, gén represszióval, gén represszió feloldásával vagy gén transzrepresszióval (Germain és mtsai., 2006). Jelenleg 48 humán nukleáris receptor ismert (Germain és mtsai., 2006), csoportba sorolásuk az aminosav szekvenciájuk homológiáján alapszik (7 alcsalád). Legnagyobb mennyiségben a májban expresszálódnak, de megtalálhatók a vesében, a szívben és az agyban is.

4. táblázat: A P450 gének indukciójában résztvevő receptorok (rövidítések: bHLH: basic helix-loop-helix, PAS: Per-Arnt-Sim)

P450	Receptor	Receptor típusa
CYP1A	AhR	bHLH/PAS családba tartozó nukleáris receptorok
CYP2B	CAR, PXR	
CYP2C	GR, CAR, PXR, VDR	
CYP3A	GR, CAR, PXR, VDR	
CYP4A	PPAR α	

A VDR (NR1I1), a PXR (NR1I2) és a CAR (NR1I3) az 1-es alcsalád, úgynevezett D-vitamin receptor típusú I csoportjának három tagja, melyet a nomenklatúrájuk is mutat. A PPAR α (NR1C1) szintén az 1-es alcsaládba, azonban külön csoportba tartozik (C csoport). Csoportba sorolásuk alapján látható, hogy ez a négy receptor elég nagy homológiát mutat, melyből következik, hogy tulajdonságaikat tekintve is nagy a hasonlóság köztük (szerkezet, ligandkötés, aktiválás folyamata). Szerkezetében és funkcióját tekintve is teljesen eltérő a GR (NR3C1), mely a 3-as alcsalád (szteroid hormon receptorok) C csoportjának (3-ketoszteroid receptorok) első tagja. Annak ellenére, hogy a receptor aktiválás folyamatának főbb lépései azonosak (ld. később), a CAR és PXR, valamint a GR tulajdonságaikat tekintve alapvető különbségeket mutatnak.

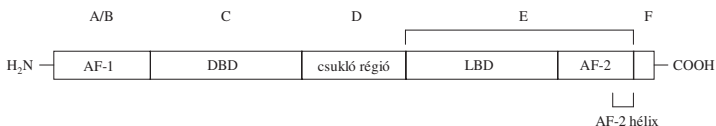
A nukleáris receptorok felfedezésekor sokuknak a természetes endogén ligandjai nem voltak még ismertek, ezért az úgynevezett „orphan” receptorok közé sorolták őket. Az endogén ligandok (5. táblázat) megismerésével („adopted orphan” receptorok) bebizonyosodott, hogy ezek a receptorok a P450 expresszió módosításával képesek az endogén hormonális változásokra reagálni, ezáltal kulcsfontosságú szerepük van a homeosztázis fenntartásában (Waxman, 1999).

5. táblázat: A P450 indukcióban résztvevő legfontosabb nukleáris receptorok és endogén ligandjaik, valamint a P450 célgénekben található receptor kötőhelyek (Waxman, 1999), *: inverz agonista (rövidítések:

DR: direct repeat, ER: everted repeat)

Nukleáris receptor	Endogén ligand	Preferált DNS szekvenciák
CAR	androsztanól*, androsztenol*	DR4
PXR	pregnenolon, kortikoszteron	DR3, ER6
VDR	D ₃ -vitamin	DR3
PPAR α	arachidonsav, linolénsav	DR1

A nukleáris receptorok felépítése nagyjából azonos struktúrával jellemezhető, 5-6 doménre tagolódik, melyeket az N-terminálistól a C-terminális felé haladva A-tól F-ig jelölnek (Giguere és mtsai., 1986; Krust és mtsai., 1986) (6. ábra). A két legfontosabb domén, a DNS-kötő domén (DBD, C régió) és a ligand-kötő domén (LBD, E régió) a nukleáris receptorok legkonzervatívabb régiói. Az N-terminális ligandfüggetlen transzkripció aktiváló funkcióval rendelkező AF-1 doménje (A/B régió), valamint a csukló régió (D) variábilisabb, az F régió pedig egyes receptorokban teljesen hiányzik és funkciója is kevésbé ismert (Germain és mtsai., 2006).



6. ábra: A nukleáris receptorok általános felépítése (rövidítések: AF-1: activation function, ligand független aktiváló funkció, DBD: DNS-kötő domén, LBD: ligand-kötő domén, AF-2: ligandfüggő aktiváló funkció)

Az AF-1, az AF-2-től eltérően, a nukleáris receptorok többi doménjének megléte nélkül is képes transzaktiváló hatását kifejezni, ezt hívjuk ligandfüggetlen aktiváló funkciónak. Azonban a teljes hosszúságú nukleáris receptor esetén az AF-1 aktivitását szintén szabályozza a ligand kötődése a LBD-hez. Az AF-1 régió számos foszforilációs helyet tartalmaz (például Ser66/MAPK; Ser68/TFIIH), mely a poszttranszlációs módosítások célpontja. Ezenkívül transzkripciós faktorokkal, illetve koaktivátorokkal lép kölcsönhatásba, valamint egyes receptorok esetén (androgén receptor, ösztrogén receptor, progeszteron receptor) megfigyelhető az N-terminális/C-terminális kapcsolat kialakulása is (Ikonen és mtsai., 1997).

A nukleáris receptorok a központi DBD-en (C régió) keresztül kötődnek a célgénnek specifikus DNS-szekvenciáihoz. A DBD konzervatív 66 aminosavból álló magja két,

ciszteinben gazdag Zn-ujj szerkezeti motívumot, két α -hélixet és úgynevezett P, D, T valamint A boxokat tartalmaz. A boxok határozzák meg, hogy az adott nukleáris receptor mely DNS kötéshelyeket ismeri fel a célgénekben, valamint a kialakuló receptor dimerek DBD-je közt létesítenek kapcsolatot (Umesono és Evans, 1989). Az adott nukleáris receptor DBD-je is részt vesz a különböző egyéb transzkripció faktorokkal és koregulátorokkal létrejövő kapcsolat kialakulásában. A csukló régió (D) biztosítja a LBD és DBD konformációváltozással járó elmozdulását, valamint nukleáris lokalizációs szignál szakaszt is tartalmaz, mely a receptor transzlokációját biztosítja a citoplazmából a sejtmagba (Germain és mtsai., 2006).

A LBD (E) kevésbé konzervatív, mint a DBD, szerkezetét tekintve az alábbi négy külön szakaszra tagolható, melyek funkcionálisan összekapcsoltak: 1., dimerizációs felszín, mely a homo-, illetve heterodimerek kialakulását teszi lehetővé a nukleáris receptorok között, 2., ligandkötőseb, ahová kis méretű, lipofil molekulák kötődnek ligandként, 3., koregulátorok megkötésére alkalmas felszín, melyek kötődve a receptorhoz, modulálják a transzkripció aktivitást, 4., AF-2 régió, melyen belül a konzervatív AF-2 hélix domén megléte szükséges a ligandfüggő gén transzaktiváláshoz és a koaktivátorok „toborzásához”. Néhány nukleáris receptor képes korepresszorok megkötésére is a LBD-jén keresztül (Germain és mtsai., 2006).

A LBD-en (E) belül található ligandkötőseb mérete és alakja határozza meg a ligand kötődés specifikitását és hatékonyságát, ezenkívül a receptor funkcióját is megszabja (endokrin/parakrin funkció). Például a klasszikus szteroid és thyroid hormon receptorok ligandjainak nagy affinitása (nanomólos koncentrációban már kötődnek) és specifikitása (csak néhány ligand kötődik) a kötősebük méretével magyarázható (Williams és Sigler, 1998). A ligandok a kötőseb viszonylag kis mérete miatt (progeszteron receptor esetén 422 Å, ösztrogén receptor α esetén 369 Å) több mint 60 %-át kitöltik a kötősebnek, amely egy szoros illeszkedést jelent. Ez biztosítja és magyarázza az endokrin homeosztázis szigorúan szabályozott folyamatát. A xenobiotikumok által kiváltott P450 induktív hatás során aktiválódó nukleáris receptorok kötősebe sokkal nagyobb (PXR esetén 1150 Å, PPAR γ esetén 1400 Å), kémiai szerkezetüket tekintve különféle ligandjaik ismertek és mikromólos tartományban kötődnek az adott nukleáris receptorhoz (Watkins és mtsai., 2001). A PXR-nak számos ligandja ismert, többek közt forgalomban lévő gyógyszerek is, például a taxol, rifampicin, hyperforin, dexametazon, lovasztatin és a szintén koleszterinszint csökkentő SR12813 (Watkins és mtsai., 2003; Benoit és mtsai., 2004). A ligand kötődése az első, egyben meghatározó lépés, mely a LBD konformációváltozását

előidézve, a receptort inaktív állapotból aktív állapotba „kapcsolja” át (Bourguet és mtsai., 2000).

A nukleáris receptor aktiválásában az AF-2 hélixnek kulcsfontosságú szerepe van. A ligand megkötése után az AF-2 hélix konformációváltozáson megy keresztül és egy úgynevezett aktív pozícióban stabilizálódik, melynek hatására a LBD felszíne megváltozik, így a koaktivátorok számára hozzáférhetővé válik és kötődni tudnak a LBD-hez (Benoit és mtsai., 2004). A koaktivátorok felszínén található konzervatív, rövid, amfipatikus aminosavszekvencia részleten, az LXXLL motívumon (L=Leucin, X=bármilyen aminosav), más néven nukleáris receptor boxon keresztül alakul ki a kapcsolat a nukleáris receptorok AF-2 hélixével (Heery és mtsai., 1997). A ligandfüggő konformációváltozás eredményeként a koaktivátorok kötődésével, a koaktivátorok mintegy lehorgonyozzák a nukleáris receptorokat a célgénjeikhez. Az AF-2 hélix gyakorlatilag a ligandkötőszob „fedeleként” funkcionál, a nukleáris receptor-koaktivátor kapcsolat kialakulásához úgynevezett zárt állapotban kell lennie, míg a nukleáris receptor-korepresszor interakció során az AF-2 hélix nyitott állapota szükséges. A korepresszorok nukleáris receptor boxa, melyen keresztül kapcsolatot létesítenek az AF-2 hélixel, a szintén konzervatív, LXXXIXXX[I/L] (I=Izoleucin) motívum. Amikor az AF-2 hélix aktív pozícióba kerül (zárt állapot) a korepresszorok kötése gátolt (Benoit és mtsai., 2004).

A nukleáris receptorok által történő transzkripció szabályzását a korepresszorok és koaktivátorok nagyban módosítják. Önmaguk a koregulátor fehérjék nem kötődnek a DNS-hez. A koaktivátorok a ligandfüggő nukleáris receptor aktiválásán keresztül szabályozódó gének alap transzkripcióját képesek fokozni. Hiszton acetil-transzferáz aktivitásuk révén (Chen, 2000) a hisztonok lizin oldalláncainak acetilezésével gyengítik a hisztonok pozitívan töltött lizin oldalláncai és a DNS negatívan töltött foszfát csoportjai között kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatást, melynek következtében a kromatin relaxálódik és a DNS a transzkripció apparátus (RNS polimeráz II, transzkripció faktorok) számára hozzáférhetővé válik (Roeder, 1996). Meg kell jegyezni azonban, hogy nem minden koaktivátornak van hiszton acetil-transzferáz aktivitása, ezek a koaktivátorok további olyan fehérjéket toboroznak (például TRAP/DRIP komplex, thyroid receptor associated protein/vitamin-D receptor interacting protein) melyek képesek a hisztonok lizinjeit acetilezni (Malik és Roeder, 2000). Az ismert koaktivátorok száma több mint száz, a legismertebbek a p160, p300 és a CBP (cAMP response element-binding protein) családba tartozók (Vo és Goodman, 2001). A p160 család SRC-1 (szteroid hormon receptor koaktivátor-1) és TIF2 (transcription intermediary factor 2, de SRC-2-ként vagy

GRIP1-ként is ismert) tagjai a CAR-hoz kötődve a CYP2B6 transzkripciójának szabályzásában is részt vesznek.

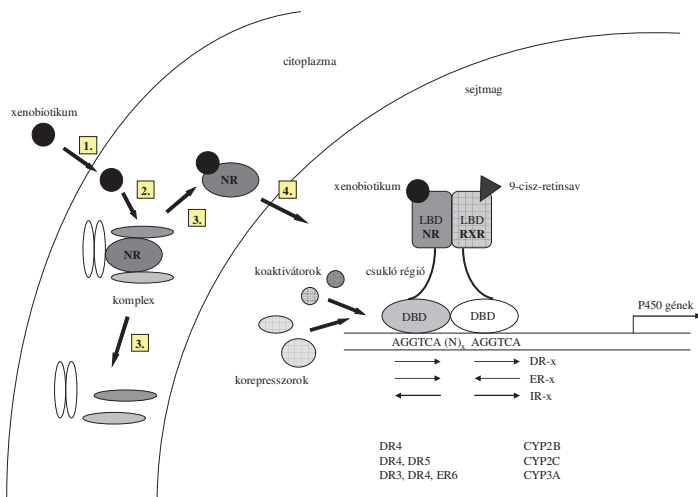
A gén expresszió aktiválásán kívül, a koregulátorok másik nagy csoportjába tartozó korepresszorok hatására a nukleáris receptorokon keresztül szabályozódó gén transzkripció gátlása tapasztalható (Baniahmad és mtsai., 1995). A korepresszorok hatására kialakuló gén expresszió csökkenés akkor alakul ki, amikor a receptor inaktív állapotban van (nem köt ligandot). A koaktivátorokkal ellentétben a korepresszorok hiszton deacetiláz aktivitással rendelkeznek. Két legjelentősebb korepresszor a NCoR (nukleáris korepresszor) és a SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor). Érdekes módon sem a NCoR-nak sem a SMRT-nak nincs hiszton deacetiláz enzim aktivitása, hanem olyan nagy molekulatömegű transzkripciós komplexeket alakítanak ki egyéb fehérjékkel, melyek rendelkeznek hiszton deacetiláz aktivitással. A hisztonok lizin oldalláncainak deacetilezésével az oldallánc pozitív töltésű lesz, így az elektrosztatikus kölcsönhatás erősödik a DNS negatívan töltött foszfát csoportjaival, mely egy kondenzált kromatin állományt eredményez, gátolva a transzkripciót (Torchia és mtsai., 1998).

Általánosságban elmondható, hogy a ligand nélküli, inaktív nukleáris receptorok korepresszorokkal lépnek kölcsönhatásba, ezáltal idézik elő represszív hatásukat a transzkripcióra, míg a ligandot kötő, aktív nukleáris receptorok a koaktivátorok toborzásával fejtik ki transzkripció fokozó hatásukat (Torchia és mtsai., 1998). Egyes megfigyelések szerint néhány korepresszor a ligandot kötő aktív nukleáris receptorokhoz is képes kötődni és a koaktivátorokat próbálják leszorítani a nukleáris receptorokról, így fejtve ki hatásukat (például ösztrogén receptor esetén) (Delage-Mourroux és mtsai., 2000; White és mtsai., 2004).

A P450 indukció molekuláris mechanizmusának főbb lépései a következők: a megfelelő ligand sejtbe jutásakor (7. ábra 1.) (pl. egy xenobiotikum), az inaktív állapotban a citoplazmában elhelyezkedő nukleáris receptort a ligand közvetlenül vagy szignál transzdukcióval aktiválja, melynek hatására a nukleáris receptort tartalmazó fehérjekomplex disszociál (7. ábra 2.), a ligand bekötődik a nukleáris receptor ligandkötőzsebébe (csak ligandfüggő receptor aktiválás során) (7. ábra 3.), a nukleáris receptor konformációja megváltozik, ami végsősoron a receptor aktiválását eredményezi és bejut a sejtmagba (7. ábra 4.). A sejtmagban a megfelelő dimerizációs partnerrel homo- vagy heterodimert képezve a dimer a cél gén promoter régiójában található xenobiotikum érzékeny szakaszokhoz (XRE) kötődve modulálja az adott gén transzkripcióját (7. ábra). A dimerizációs partner ebben a folyamatban többnyire a szintén a nukleáris receptorok

családjába tartozó retinoid X receptor α (RXR α /NR2B1, későbbiekben RXR-nak rövidítve).

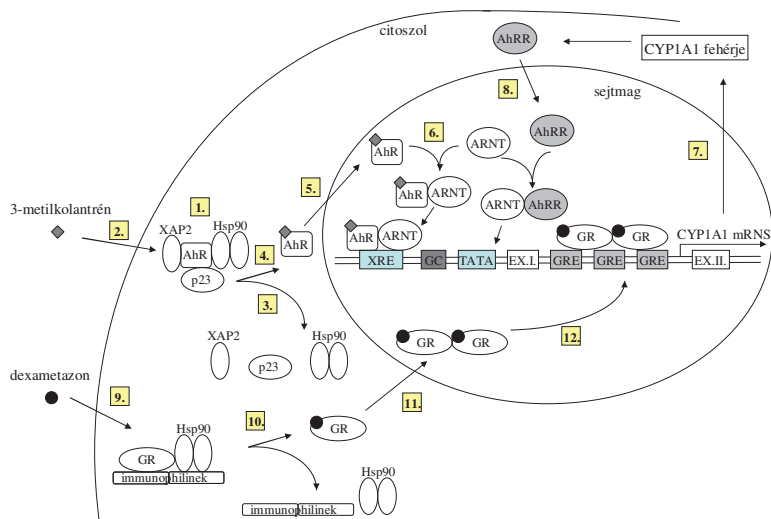
A klasszikus szteroid hormon típusú nukleáris receptorok (pl. a GR, az androgén receptor, a progeszteron receptor és a mineralokortikoid receptor) a palindróm AGAACA-N₃-TGTCTTCT szekvenciához kötődnek a cél gének promoter régiójában, míg a nem szteroid hormon típusú receptorok (CAR, PXR, VDR, RXR) és az ösztrogén receptor az ismételt AG(G/T)TCA szekvenciához kapcsolódnak. Az ismétlődő szekvenciát 1-7 nukleotid választja el egymástól, a szekvenciákat elválasztó nukleotidok száma határozza meg a hetero- vagy homodimert képező receptorok kötődésének specititását. A szekvencia irányultságát tekintve egyirányú (direct repeat DR), ellentétes (inverted repeat IR) vagy fordított (everted repeat ER) lehet (7. ábra) (Honkakoski és Negishi, 2000).



7. ábra: P450 indukció molekuláris mechanizmusának főbb lépései: 1. a megfelelő xenobiotikum bejut a sejtbe, 2. a xenobiotikum hatására a komplex disszociál, a nukleáris receptor szabaddá válik 3. a xenobiotikum bekötődik a nukleáris receptor LBD kötőhelyére, és a receptor aktiválódik, 4. az aktivált nukleáris receptor/xenobiotikum komplex bejut a sejtmagba, ahol a dimerizációs partnerrel (RXR) heterodimert képezve kötődik az XRE-okhoz, ezáltal modulálva a P450 gének transzkripcióját. A folyamatban koaktivátorok és korepresszorok is részt vesznek (rövidítések: DBD: DNS-kötő domén, LBD: ligandkötő domén, NR: nukleáris receptor, RXR: retinoid X receptor, DR: direct repeat, ER: everted repeat, IR: inverted repeat)

2.3.1 CYP1A1 gén szabályzás

A CYP1A alcsaládot a CYP1A1 és CYP1A2 alkotja. A CYP1A1 elsősorban a tüdőben fejeződik ki, alapszintje a májban nem detektálható, a CYP1A2 is csak kis mértékben expresszálódik. PAH-vegyületekkel indukálhatók (TCDD, 3-metilkolantrén, cigarettafüst egyes komponensei). A CYP1A1-nek a gyógyszermetabolizmusban nincs jelentős szerepe, a CYP1A2 katalizálja a fenacetin, koffein, teofillin metabolizmusát. A CYP1A1 a prekarcinogén anyagok aktiválásában, a CYP1A2 pedig a karcinogénaktiválás folyamatában vesz részt (1. ábra).

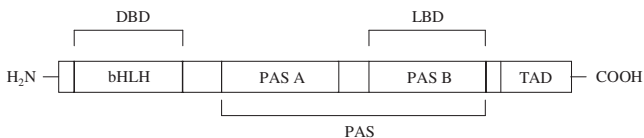


8. ábra: CYP1A1 regulációja (rövidítések: AhR: aromás szénhidrogén receptor, AhRR: AhR represszor, ARNT: AhR nukleáris transzlokátor, Hsp90: hőszokk fehérje, p23: protein 23, XAP2: hepatitis B vírus X-associated protein, GR: glükokortikoid receptor, GRE: glükokortikoid érzékeny szakasz, XRE: xenobiotikum érzékeny szakasz)

Alap állapotban az AhR számos fehérjével komplexet alkotva (Hsp90, XAP2, p23) a citoplazmában helyezkedik el (8. ábra 1.). A megfelelő induktor sejtbe jutásakor (3-metilkolantrén, TCDD) (8. ábra 2.) a komplex disszociál (8. ábra 3.), az induktor vegyület kötődik a receptorhoz és az AhR aktiválódik (ligandfüggő receptor aktiválás) (8. ábra 4.). Az AhR/3-metilkolantrén komplex bejut a sejtmagba (8. ábra 5.), ahol az AhR nukleáris

transzlokátorral (ARNT) heterodimert képezve bekötődik a CYP1A1 gén promoterében található XRE szakaszokhoz, fokozva ezáltal a CYP1A1 gén átíródását (8. ábra 6.), melynek következtében a CYP1A1 enzim fehérje mennyisége az endoplazmás retikulumban megnő (8. ábra 7.) (Reyes és mtsai., 1992; Kobayashi és mtsai., 1996; Mimura és Fujii-Kuriyama, 2003; Matsushita és mtsai., 1993). Visszacsatoló szabályozó mechanizmusként, a CYP1A1 enzim fehérje megjelenésekor az AhR represszor (AhRR) aktiválódik és az ARNT-tal heterodimert képezve gátolja a gén további transzkripcióját (8. ábra 8.) (Baba és mtsai., 2001).

Az AhR és ARNT szerkezeti felépítése hasonló (9. ábra), az N-terminálishoz közel eső bHLH doménben a két α -hélixet egy hurok választja el egymástól. Az AhR/ARNT heterodimer az AhR és ARNT bHLH doménjeinek kapcsolódásán keresztül alakul ki, egyben ez a DNS-kötő domén. A PAS domén szintén szükséges a heterodimer kialakulásához. Az AhR PAS doménjében található a ligandkötő régió (PASB), mely a ligandon kívül a Hsp90 chaperon fehérje megkötésére is alkalmas. Az AhR és ARNT C-terminálisán található a transzkripció aktivitással rendelkező domén (TAD) (Fukunaga és mtsai., 1995). A citoszolban az AhR gyorsan degradálódik, így inaktív állapotban (ligand nélküli AhR) az AhR komplexet képez a Hsp90-el és egyéb immunophilin típusú fehérjével, melyek megvédik a receptort a degradációtól. További szerepük még a nukleáris lokalizációs szignál elnyomása és ezáltal az inaktív receptor visszatartása a citoszolban (Roberts és Whitelaw, 1999).



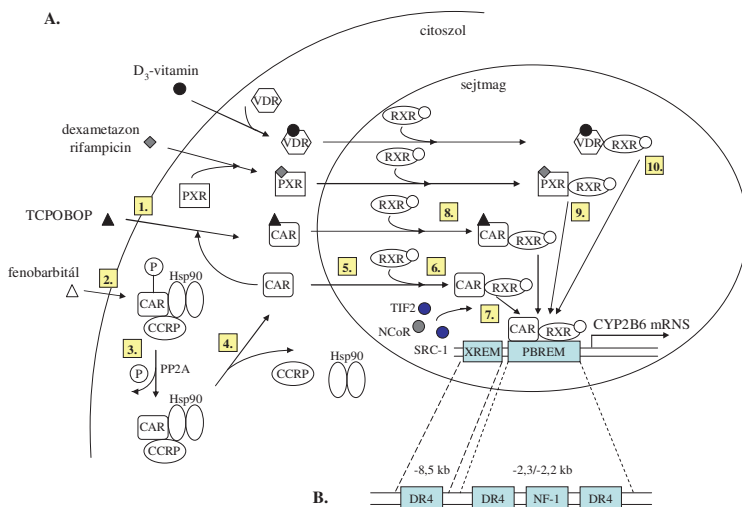
9. ábra: Az AhR szerkezeti felépítése (rövidítések: bHLH: basic helix-loop-helix, PAS: Per-Arnt-Sim, LBD: ligandkötő domén, DBD: DNS-kötő domén, TAD: transcriptional activation function)

A CYP1A1 gén átíródása csak a II. exontól indul, azonban az I. intron régióban három igen fontos szabályozó szakasz, a glükokortikoid érzékeny szakaszok (GRE) található, melyeken keresztül a PAH-vegyületekkel kiváltott CYP1A1 indukciós hatás módosul. A glükokortikoidok (dexametazon) a sejtbe jutva (8. ábra 9.) a GR-hoz kötődnek, mely a receptor konformációváltozását idézi elő és ezáltal aktiválódik (8. ábra 10.). Az

aktivált GR/dexametazon komplex a sejtmagba jutás után homodimert képez (8. ábra 11.) és bekötődik a CYP1A1 I. intronjában található GRE szakaszaihoz (8. ábra 12.). A dexametazon közvetett módon befolyásolja a CYP1A1 gén expresszióját, önmagában csak kis mértékben van hatással a CYP1A aktivitására, a hatás kiváltásához szükség van a XRE szakaszokhoz kötődő aktivált AhR induktív hatására (Linder és mtsai., 1999).

2.3.2 CYP2B6 gén szabályzás

A CYP2B6 legismertebb induktor vegyülete a gyógyszerként alkalmazott, antikonvulzánsok körébe tartozó fenobarbitál, de számos más vegyülettel indukálható még, úgy mint dexametazonnal, rifampicinnel, D₃-vitaminnal, valamint egér májsejtekben 3,3',5,5'-tetraklór-1,4-bis(piridiloxi)benzollal (TCPOBOP) (10. ábra).



10. ábra: CYP2B6 regulációja (rövidítések: Hsp90: hősokk fehérje, CCRP: cytoplasmic CAR retention protein, PP2A: protein foszfatáz, VDR: D-vitamin receptor, PXR: pregnán X receptor, CAR: konstitutív androsztán receptor, RXR: retinoid X receptor, PBREM: fenobarbitál érzékeny szakasz, XREM: xenobiotikum érzékeny szakasz, NF-1: nuclear factor-1, DR: direct repeat, SRC-1: szteroid hormon receptor koaktivátor, TIF2: transcription intermediary factor, NCoR: nukleáris korepressor)

Igen nagy áttörést jelentett, amikor 1995-ben Trotter és mtsainak sikerült egy fenobarbitál-érzékeny aktiváló régiót izolálniuk a patkány CYP2B2 gén promoterében,

melyet PBRU-nak (phenobarbital responsive enhancer unit) neveztek el. 1996-ban *in vivo* patkánykísérletek során bizonyították, hogy a PBRU nukleáris receptorok megkötésére alkalmas DNS-szekvenciákat tartalmaz és a CYP2B2 indukciójában kulcsfontosságú szerepe van (Park és mtsai., 1996). Ugyanebben az évben Honkakoski és mtsai szintén azonosították a PBRU szekvencia meglétét az egér Cyp2b10 génben (phenobarbital responsive enhancer module, PBREM). A humán CYP2B6 PBREM (-2,3/-2,2 kb) szakaszát 1999-ben Sueyoshi írta le először. Az 51 bázispár hosszúságú PBREM szakasz két konzervatív elrendezést mutató DR4-et tartalmaz (nukleáris receptor kötőhelyek: NR1 és NR2), melyet egy nukleáris faktor (NF-1) választ el egymástól (10. B. ábra). 2003-ban Wang és mtsainak sikerült a CYP2B6 5' végéhez közelebb eső (-8,5 kb) még egy DR4 szakaszt (XREM) izolálniuk (10. B. ábra). A NF-1 funkciója egyelőre nem teljesen tisztázott, Stoltz és Anderson (1999) szerint a PBRU-n keresztül történő CYP2B indukciójához az NF-1 megléte szükséges. A PBREM-on belül a NR1 és NR2 aktiválhatósága nem egyforma, megfigyelték, hogy fenobarbitállal kezelt egerek májsejtjeiben a CAR túlnyomórészt a NR1 szekvenciához kötődik (Handschin és Meyer, 2003).

A CYP2B6 indukciója elsősorban a CAR aktiválásán keresztül történik. A CAR aktiválása történhet közvetlen ligand kötődéssel a receptorhoz (10. A. ábra 1.) illetve szignál transzdukcióval (10. A. ábra 2.). Fenobarbitál hatására a CAR első lépésben defoszforileződik (10. A. ábra 3.), melyet a protein foszfatáz 2A katalizál, a komplexből disszociál (10. A. ábra 4.), és az így aktivált CAR a citoszolból a sejtmagba lép (10. A. ábra 5.), ahol több szignáltranszdukciós lépést követően, melyben több kináz is részt vesz (CaMK II, ERK1/2, PKA), az RXR-ral heterodimert képezve (10. A. ábra 6.) kötődik a PBREM NR1 és NR2 szakaszaihoz, fokozva ezzel a CYP2B6 átíródását (10. A. ábra 7.) (Kawamoto és mtsai., 1999; Joannard és mtsai., 2000). A szignáltranszdukcióval történő receptor aktiválást az okadánsav, egy szelektív protein foszfatáz 2A inhibitor hatására bekövetkező protein foszfatáz 2A gátlásával bizonyították. Okadánsav jelenlétében a CAR transzlokációja a sejtmagba nem történik meg, így a CYP2B6 indukciója sem következik be (Kawamoto és mtsai., 1999). Azonban a szignáltranszdukció teljes folyamata a mai napig nem tisztázott. Tumoros sejtvonalakban (például HepG2) igen nagy problémát jelent a CAR konstitutív aktivitásából fakadó magas alap aktivitása, mely végsősoron induktor jelenléte nélkül is a receptor spontán transzlokációját idézi elő a sejtmagba (Moore és mtsai., 2000).

Egér májsejtekben megfigyelték, hogy a TCPOBOP szelektív egér CAR agonista hatására a CAR aktiválódik (10. A. ábra 8.). A receptor aktiválásához szükség van arra, hogy a TCPOBOP agonistaként kötődjön a CAR-hoz (10. A. ábra 1.). Ezt bizonyítja Tzameli és mtsainak (2000) munkája, mely szerint androsztanol, egy inverz CAR agonista (Forman és mtsai., 1998) jelenlétében, a TCPOBOP és az androsztanol közvetlenül versengenek a CAR LBD-jének birtoklásáért.

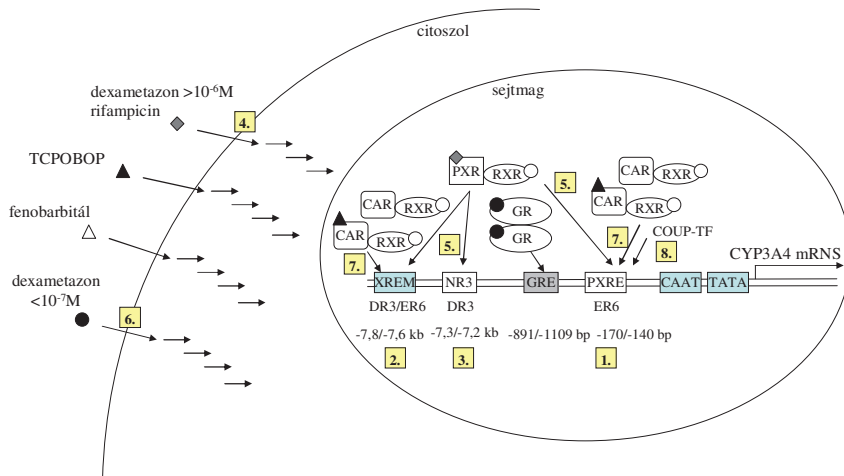
A PBREM szakaszhoz nemcsak a CAR/RXR, hanem a PXR/RXR (10. A. ábra 9.) és a VDR/RXR (10. A. ábra 10.) heterodimerek is képesek kötődni (úgynevezett „cross-talk” hatás létezik a nukleáris receptorok között) (Goodwin és mtsai., 2001, Wang és Negishi, 2003). Például a dexametazon, a rifampicin és a D₃-vitamin a PXR és a VDR aktiválásán keresztül fejti ki inductív hatását a CYP2B6-ra.

2.3.3 CYP3A4 gén szabályzás

A dexametazon és a rifampicin a CYP3A klasszikus induktorvegyületeinek tekinthető. A humán CYP3A4 génben azonosított aktiváló régiók a fajok között nagyobb heterogenitást mutatnak összehasonlítva például a CYP2B erősen konzervatív PBRU régiójához képest, mely minden fajban szinte azonos. A CYP3A4 proximális promoter régiójában (-170/-140 bp) található PXR érzékeny szakasz (PXRE) tartalmaz egy ER6 elrendezésű szekvenciát melyhez elsősorban a PXR/RXR heterodimer kötődik. Ez a legfontosabb reguláló szakasza a génnek (11. ábra 1.). További kötőhelyeket is azonosítottak, ezek közül a legjelentősebb a CYP3A4 5' végéhez közel eső (-7,8/-7,6 kb) 230 bázispár hosszúságú XREM régió (11. ábra 2.), mely egy DR3 és egy ER6 szekvenciát tartalmaz (Goodwin és mtsai., 1999). Egyértelműen bizonyított, hogy a CYP3A4 indukcióját kiváltó dexametazon/rifampicin- és fenobarbitál-típusú induktorok hatására a XREM régió aktiválódik. A CYP3A4 és a CYP2B6 XREM régiójának megléte alapvetően szükséges a CYP3A4 és CYP2B6 maximális indukciójának eléréséhez (Goodwin és mtsai., 1999; Wang és mtsai., 2003). A XREM melletti, -7,3/-7,2 kb-nál található további DR3 szerepe még nem teljesen tisztázott (11. ábra 3.), de kétségtelenül hozzájárul az indukció kialakulásához (Quattrochi és Guzelian, 2001).

A CYP3A indukciója komplex folyamat, több nukleáris receptor aktiválásán keresztül történik, azonban elsődlegesen a PXR szabályzása alatt áll. A ligand (rifampicin, dexametazon) sejtbe jutásakor (11. ábra 4.) az inaktív állapotban a citoplazmában elhelyezkedő PXR aktiválódik, majd az induktor/PXR komplex a sejtmagba vándorol, ahol az RXR-al heterodimert képez és bekötődik a XREM, PXRE valamint NR3 nukleáris

receptorok megkötésére alkalmas szekvenciákhoz (11. ábra 5.) (Quattrochi és Guzelian, 2001).



11. ábra: CYP3A4 regulációja (rövidítések: GRE: glükokortikoid érzékeny szakasz, PXRE: PXR érzékeny szakasz, XREM: xenobiotikum érzékeny szakasz, GR: glükokortikoid receptor, CAR: konstitutív androsztán receptor, PXR: pregnán X receptor, RXR: retinoid X receptor, COUP-TF: chicken ovalbumin upstream promoter faktor)

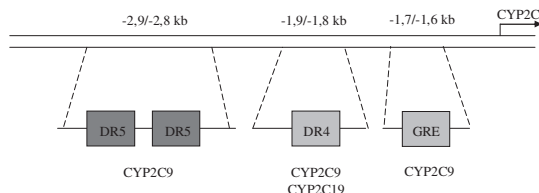
A CYP3A4 promoterében található GRE a glükokortikoidok által aktivált GR homodimer komplex megkötésére alkalmas, melynek hatására fokozódik a CYP3A4 transzkripciója. A GR aktiválása már alacsonyabb glükokortikoid (dexametazon $<10^{-7}M$) koncentráció mellett elérhető (11. ábra 6.). A PXR aktiválásához viszont magasabb glükokortikoid koncentráció (dexametazon $>10^{-6}M$) szükséges (11. ábra 4.). A dexametazon szubmikromólos koncentrációban alkalmazva, feltehetőleg a GR aktiválásán keresztül fokozza a CAR, PXR és RXR expresszióját is (Pascussi és mtsai., 2001).

A nukleáris receptorok között létrejövő „cross-talk” hatás (Pascussi és mtsai., 2003/2), melyet a CYP2B6 indukciójánál is tapasztalhatunk (ld. 24. o.), a CYP3A4 indukciója során is megfigyelhető. A CYP3A4 PXRE és XREM régiójának ER6 szekvenciáihoz a PXR/RXR heterodimeren kívül a CAR/RXR is képes kötődni, modulálva ezáltal a gén átíródását (11. ábra 7.). A CYP3A4 indukcióját módosítja a COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter faktor), mely kompetitív módon gátolja a

PXR/RXR kötődését a PXRE-hez, valamint közvetett módon a hepatocyta nukleáris faktor 4- α által fenntartott alaptranszkripciót is gátolni képes (11. ábra 8.).

2.3.4 CYP2C gének szabályzása

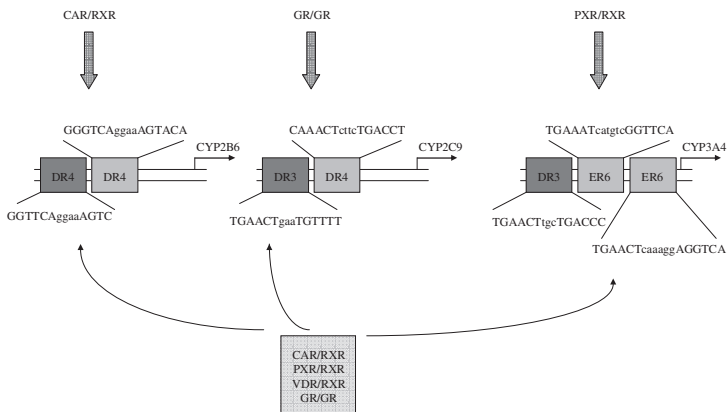
A humán CYP2C alcslád tagjai közül a CYP2C8, CYP2C9 és a CYP2C19 génekben is megtalálható a PBREM régió (-1,9/-1,8 kb), melynek DR4 kötőhelyéhez a CAR/RXR-on kívül a PXR/RXR, valamint GR/GR is képes kötődni (12. ábra). A klasszikus CYP2B6 és CYP3A4 induktorok, például a fenobarbitál, dexametazon és rifampicin ezen a kötőhelyen keresztül képes induktív hatását kifejteni a CYP2C-re (Gerbal-Chaloin és mtsai., 2002). A xenobiotikumok induktív hatása a CYP2C-re elsősorban a DR4 (-1,9/-1,8 kb) kötőhelyen keresztül alakul ki. A CYP2C9 és CYP2C19 DR4 kötőhelye nagyfokú homológiát mutat, csupán egy nukleotid különbség van közöttük (Ferguson és mtsai., 2002/1). A CYP2C alcslád tagjai közül humán májsejtekben a CYP2C8 és CYP2C9 indukálható leginkább. A CYP2C8 és CYP2C9 gének promoterében azonosítottak még egy GRE régiót is (-1,7/-1,6 kb), melyen keresztül a glükokortikoidok képesek a gének transzaktiválására (12. ábra) (Gerbal Chaloin és mtsai., 2001, 2002). A CYP2C9 elsődlegesen a GR szabályzása alatt áll (13. ábra), azonban a különböző nukleáris receptor kötőhelyek a glükokortikoidok (GR) és xenobiotikumok (CAR, PXR) hatására létrejövő komplex szabályzást tesznek lehetővé (Gerbal-Chaloin és mtsai., 2001, 2002). A CYP2C9 promoterében található még két DR5 kötőhely (-2,9/-2,8 kb), melyek szerepe kevésbé ismert (Ferguson és mtsai., 2002/3).



12. ábra: A humán CYP2C9 és CYP2C19 génekben található nukleáris receptor kötőhelyek (rövidítések: DR: direct repeat, GRE: glükokortikoid érzékeny szakasz)

A CYP2-3 gének szabályzása komplex folyamat tehát, transzkripciójukat az endogén vegyületeken kívül, számos xenobiotikum befolyásolja. A CYP2B alcslád elsődlegesen a

CAR, a CYP2C a GR, míg a CYP3A a PXR szabályozása alatt áll, azonban megfigyelhető, hogy a maximális indukció kialakulásakor egyszerre több nukleáris receptor is aktiválódik és a végső hatás a nukleáris receptorok „cross-talk” hatása révén alakul ki (13. ábra). Ennek oka, hogy a P450 génekben található nukleáris receptor kötőhelyek több különböző receptor megkötésére alkalmasak.

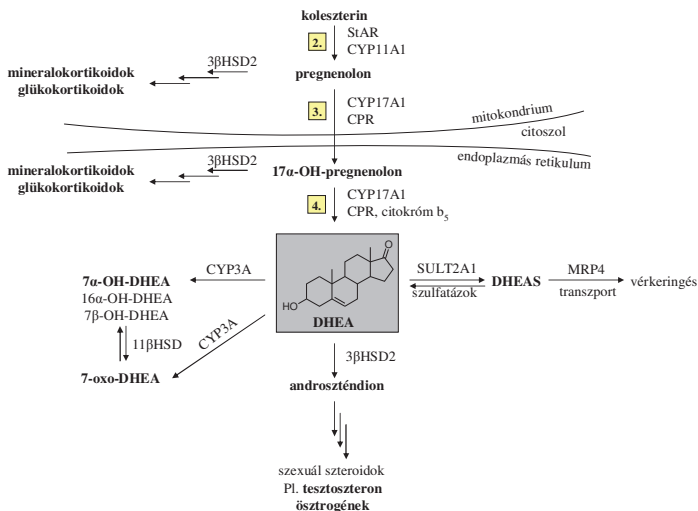


13. ábra: A nukleáris receptorok közt létrejövő „cross-talk” hatás kialakulására példa a CYP2B6, CYP2C9 és CYP3A4 gén szabályzásán keresztül (Pascussi és mtsai., 2003/2)

2.4 DHEA szerepe az emberi szervezetben

A DHEA és szulfát észtere (DHEAS) négy lépést követően koleszterinből képződik a *de novo* szteroid hormon bioszintézis (14. ábra) során a mellékvesekéreg zona reticulárisában (15. ábra) (Ghayee és Auchus, 2007). 1. Első lépésként a lipoproteinekbe „csomagolt” koleszterin bejutva a sejtbe vakuolákban tárolódik. A vakuolából a mitokondrium külső membránjába töltődik. Megfelelő szignál hatására a koleszterin mobilizálódik és a steroidogenic acute regulatory protein segítségével (StAR) a mitokondrium belső membránjába szállítódik (Bose és mtsai., 2002). 2. Második lépésben a mitokondriumban megtörténik a koleszterin-pregnenolon átalakulás (14. ábra 2.), melyet a koleszterin oldallánc hasító enzim (CYP11A1=P450_{scc}, *side chain cleavage*) katalizál. Az összes szteroid hormon bioszintézise során ez a sebességmeghatározó lépés (Miller, 2002). Miután a P450_{scc} csak a mitokondriumban belül működőképes (Black és mtsai., 1994), éppen ezért a koleszterin bejutása a mitokondriumba a StAR segítségével kritikus

lépés. A StAR szerepének fontosságát jelzi az is, hogy a StAR gén mutációja kongenitális lipoid mellékvese hyperpláziát okoz (Lin és mtsai., 1995). 3. Harmadik lépésben a CYP17A1 (P450c17) katalizálta folyamatban a pregnenolon 17-es α pozícióban hidroxileződik (14. ábra 3.). 4. Végül a 17 α -OH-pregnenolon a CYP17A1 17,20-liáz aktivitásának köszönhetően DHEA-ná alakul át (14. ábra 4.).



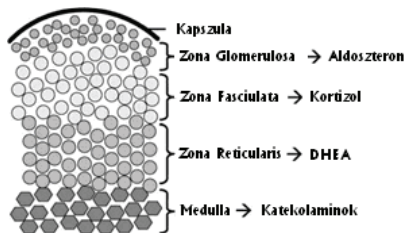
14. ábra: A DHEA szerepe az emberi szervezetben. A DHEA képződése nagyban függ a StAR fehérje, a CYP11A1, a CYP17A1 és a szulfotranszferáz 2A1 (SULT2A1) expressziós profiljától. A citokróm P450 enzimek expressziója zóna specifikus a mellékvese kérgi állományában. A DHEAS szintézist elősegíti a citokróm P450 oxidoreduktáz (CPR) és a citokróm b₅ is. A DHEAS szintézisét gátolja a 3 β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 2 (3 β HSD2) működése, mely irreverzibilisen alakítja át a DHEAS prekursorokat mineralokortikoidokká és glükokortikoidokká (forrás: Clin. Endocrinol., 2004., Blackwell Publishing, www.medspace.com, Takemori és Kominami, 1984; Hanukoglu, 1992)

A CYP17A1 mintegy minőségi szabályozó funkciót ellátva megszabja, mely típusú szteroid hormonok szintetizálódnak. Ha a CYP17A1 nincs jelen, akkor 21 szénatomos 17-dezoxiszteroidok szintetizálódnak (ilyen például a zona glomerulosában az aldoszteron), ha csak 17 α -hidroxilázként működik, 21 szénatomos 17-hidroxiszteroidok szintetizálódnak (kortizol), ha pedig 17 α -hidroxilázként és 17,20-liázként egyaránt funkcionál, 19 szénatomos prekursorok szintetizálódnak (DHEA) (Miller, 2002). A CYP17A1 a CYP11A1-el ellentétben nem a mitokondriumban hanem az endoplazmás

retikulum membránjában található. A CYP17A1 17,20-liáz és 17 α -hidroxiláz aktivitásának aránya tehát megszabja a 21 szénatomos és 19 szénatomos szteroidok szintézisének arányát. A liáz/hidroxiláz aktivitás arányt legalább három faktor is szabályozza: a citokróm P450 oxidoreduktáz, mely fokozza a CYP17A1 enzimaktivitást, a citokróm *b₅* mely szelektíven növeli a CYP17A1 17,20-liáz aktivitását, valamint a CYP17A1 Ser-jeinek foszforilációja. A veleszületett 17-hidroxiláz/17,20-liáz aktivitás defektusa a szervezet kortizol és szexuál szteroid szintézisének zavarához vezet, melyet súlyos kórképek kísérhetnek, úgy, mint például hypogonadizmus, magas vérnyomás, magas K⁺-szint, tumorok kialakulása a mellékvesében (Geller és mtsai., 1997).

De novo szteroid bioszintézis elsődlegesen a mellékvese, az ivarmirigyek és a placenta szöveteiben történik. A mellékvese és az ivarmirigyek embrionális eredete hasonló, továbbá a szteroid bioszintézis szabályzásának alapjai is azonosak mindkét szervben. A placentában a szteroidok szintézise egyenletesebb, a terhesség korai szakaszában a chorio-gonadotrop hormon szabályozása alatt áll, később pedig többnyire nem szabályozott folyamat (Ghayee és Auchus, 2007).

A mellékvese alapvető funkciója a szervezet folyadék és elektrolit háztartásának szabályozása és egyensúlyban tartása, megvédve ezáltal az emberi szervezetet a fiziológiás stressztől. A mellékvese 90 %-át a kéreg állomány (cortex) alkotja (mezodermális eredetű), a maradék 10 %-ot pedig a velő állomány (medulla, ektodermális eredetű) képezi. A kéreg állomány anatómiailag és funkcionálisan is három zónára tagolható (15. ábra).



15. ábra: A mellékvese zónái és a zónák szerinti hormon szintézis (forrás: Ghayee és Auchus, 2007)

A különböző szteroidok szintézise a mellékvesén belül zóna-specifitást mutat, a legkülső, zona glomerulosában szintetizálódnak a 21 szénatomos mineralokortikoidok (például aldoszteron), melyek a só- és vízháztartás szabályzásában vesznek részt. A középső, zona fasciculatában szintetizálódnak a szénhidrát anyagcserére ható hormonok, például a kortizol. A belső zona reticulárisban 19 szénatomos androgén típusú prekursorok

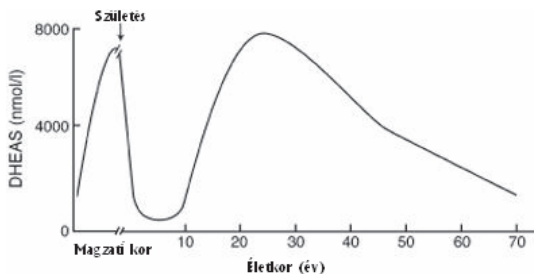
szintetizálódnak, többek között a DHEA és szulfát észtere is. A neuroendokrin eredetű sejtekből felépülő medulla állományban szintetizálódnak a katekolaminok (adrenalin, noradrenalin, dopamin) (15. ábra).

Az ivarmirigyekben történik a DHEA-ból kiinduló androgén és ösztrogén típusú hormonok szintézise, a DHEA tehát hormon prekursornak tekinthető. A petefészekben a szteroid hormonok szintézise sejt specifikus. A theca sejtek elsősorban androsztendiont szekretálnak és a granulosa sejtekben történik a 18 szénatomos ösztrogének, valamint változó mennyiségben a tesztoszteron szintézise androsztendionból kiindulva. A progeszteron a petefészek corpus luteumában szintetizálódik. A herék Leydig sejtjeiben fejeződik be a tesztoszteron bioszintézise.

A DHEA a vérkeringésben 3 β -szulfát észterként van jelen, melyet a célszövetekbe eljutva szteroid szulfatázok alakítanak át DHEA-ná (Burstein és Dorfman, 1963). A DHEA szulfatálását pedig a SULT2A1 katalizálja (14. ábra). Megfigyelések szerint a DHEA és a DHEAS folyamatosan egymásba alakulnak, a naponta termelődő DHEA 64-74 %-a alakul át DHEAS-tá, míg a DHEAS 13 %-ából lesz újból DHEA (Bird és mtsai., 1984). A DHEA plazma koncentrációja ennek következtében nagyságrendekkel kisebb (0,003-0,015 μ M), mint a DHEAS-té (3-10 μ M). A DHEA szulfotranszferáz és szteroid szulfatáz szövet-specifikus expressziója megszabja a DHEA további metabolizmusát illetve tárolását. A szteroid hormon szintézisben kizárólag a DHEA vesz részt (Webb és mtsai., 2006).

A többi mellékvese szteroidtól (aldoszteron és a kortizol) eltérően, a szérumban DHEAS koncentrációja az életkor előrehaladtával csökken (Orentreich és mtsai., 1984) (16. ábra). Magzati korban a mellékvesében a szteroid hormonok közül legnagyobb mennyiségben a DHEA termelődik, ez magyarázza a születés pillanatában a vérben keringő DHEAS maximumát (3-7 μ M) (Sizonenko és Paunier, 1975; Reiter és mtsai., 1977). Ezután a plazma DHEAS szintje egy év alatt majdhogynem a detektálható szint alá csökken. Körülbelül 10 éves kortól a mellékvese zona reticularisában fokozódó DHEA szintézis következtében a plazma DHEAS koncentrációja fiatal felnőttkorban (20-30 éves korban) újabb maximumot mutat, nőkben körülbelül 5 μ M, férfiakban 10 μ M körüli (ezt a jelenséget nevezzük adrenarche-nak). Ezt követően a DHEAS koncentrációja fokozatosan csökken, 70-80 éves korban a fiatal felnőttkorban tapasztalt csúcskoncentráció mintegy 10-20 %-át éri csak el. Az öregedéssel együttjáró fokozatos DHEAS szint csökkenés jelenségét andropauzának is szokás nevezni, melynek klasszikus kísérő jelensége a mellékvese zona reticularis méretének csökkenése (Parker és mtsai., 1997). Labrie és mtsai

(1995) szerint a CYP17A1 17,20-liáz aktivitásának csökkenése lehet felelős az életkorfüggő DHEA(S) szekréció drasztikus csökkenésének.



16. ábra: A vérben keringő DHEAS koncentrációjának változása az életkor előrehaladtával (forrás: Clin. Endocrinol., 2004., Blackwell Publishing, www.medSPACE.com)

Érdeemes megjegyeznünk, hogy ennek ellenére a glükokortikoidok és mineralokortikoidok szintézise továbbra is, egész életen át tart. A DHEA-nal ellentétben a koleszterin szérum koncentrációja nő, a kortizol szérum szintje pedig lassabban csökken vagy akár növekedhet is az életkor előrehaladtával, mely végül megnövekedett kortizol/DHEAS arányt eredményezhet. Megfigyelések szerint a kortizol/DHEAS arány eltolódása idős emberekben a kognitív funkciók romlásával társul (Kalmijn és mtsai., 1998). A növekvő életkorral járó DHEA(S) szekréció csökkenés ténye felvetette a kérdést, hogy vajon az öregedés részben a DHEA csökkenő mennyiségének következményeként alakul-e ki szükségszerűen, és ha ez így van, a DHEA kezelés a folyamatot visszafordítja, illetve lassítja-e? Az alacsony DHEAS szint egyértelműen összefügg az öregkorban kialakuló betegségek rizikójának növekedésével (elsősorban atherosclerosis, szív- és érrendszeri megbetegedések), melynek következtében nő a halálozás. Ezt magyarázza a krónikus betegségek során gyakran fellépő mellékvese szteroid bioszintézis eltolódása a kortizol képződése felé (Parker és mtsai., 1985).

Számos állatkísérlet eredménye rámutatott arra, hogy a DHEA egy „multifunkcionális” prehormon, lassítja az öregedést, depresszió során a hangulatingadozást pozitívan befolyásolja, általános közérzetjavító, stimulálja az immunrendszert (Spencer és mtsai., 1995), csökkenti a rák kialakulásának lehetőségét (Schwartz, 1979), valamint neuroaktív neurosteroidként is funkcionál (Baulieu és Robel, 1998). Ezen kívül a terápiás dózisban alkalmazott DHEA csökkenti a koleszterinszintet és

diabétesz során kontrollálja a megemelkedett vércukorszintet (Coleman és mtsai., 1982; Kawano és mtsai., 2003). Mindezen előnyös tulajdonságainak köszönhetően a DHEA az Egyesült Államokban az idősebb korosztály körében széleskörűen alkalmazott, vény nélkül kapható készítmény (ún. „anti-aging medication” során alkalmazzák) (Allolio és Arlt, 2002). Az idős embereken kívül, a DHEA izomtömegnövelő tulajdonságának köszönhetően, legnagyobb felhasználó csoportja még a testépítők köre. Étrendkiegészítőként, recept nélkül, bármely táplálékkiegészítőket, vitaminokat árusító üzletben kapható. A lakosság körében is népszerű, szinte csodaszerként nyilvántartott, az ifjúság forrásaként is emlegetett készítmény. A javasolt napi adagja nők esetén 25 mg, férfiak esetén 50 mg, mely körülbelül 50 μM -os koncentrációt biztosít a vérben. Ez messze meghaladja a fiziológiás DHEA koncentrációt, mely alapesetben 0,003-0,015 μM közötti. A készítmény nem áll a Food and Drug Administration (FDA) szabályozása alatt, így az FDA által megkövetelt szigorú minőség-ellenőrzés alól kiesik (nem szükséges feltüntetni a lejárati dátumát, nincs kémiai standard vegyület), forgalmazásához nem szükséges klinikai vizsgálatokat végezni. Éppen ezért, csak kevés, embereken végzett vizsgálatból származó klinikai adat áll rendelkezésre (Ravaglia és mtsai., 1996; Baulieu és mtsai., 2000), mely a DHEA hatékonyságát és biztonságos alkalmazását bizonyítja, az eredmények többsége állatkísérletekből származik, melyek sokszor nem vethetők össze az embereken várható hatásokkal (Webb és mtsai., 2006). Nem szabad figyelmen kívül hagynunk, hogy rágszálókban, ellentétben az emberrel, kevés a keringő DHEAS mennyisége. A DHEA klinikai alkalmazását szintén korlátozza, hogy nőkben és férfiakban egyaránt, a szexuáliszteroidok prekursoraként, megnő az androgén és ösztrogén típusú hormonok szintje, mely fokozott hormonális hatáshoz vezet (Arlt és mtsai., 1998, 1999).

Továbbá megfigyelték, hogy rágszálókban a DHEA tartós adagolása patofiziológiás folyamatokat indukál, májnagyobbodást és hepatocarcinómát idéz elő (Frenkel és mtsai., 1990; Rao és mtsai., 1992). Ennek oka, hogy a DHEA peroxiszóma proliferátorként növeli a peroxiszóma számát és méretét, mely fokozott peroxiszóma proliferációt eredményez (Wu és mtsai., 1989). Ismert, hogy a peroxiszóma proliferátorok (például: klorofibrát, nafenopin, aszpirin), így a DHEA is, megváltoztatják a zsírsav metabolizmusban szerepet játszó gének, többek közt a zsírsav CoA oxidáz, az almasav dehidrogenáz és a CYP4A1 expresszióját patkányokban és egerekben egyaránt (Webb és mtsai., 1996). Primer patkány májsejteken a DHEA és a 7-es pozícióban oxidált metabolitjai egyaránt, mind transzkripciós, mind pedig enzim szinten indukálják a zsírsav CoA oxidáz és a CYP4A-t. Az indukció a PPAR α aktiválásán keresztül történik, a DHEA nem ligandfüggő

mechanizmussal aktiválja a receptort. A CAR-hoz hasonlóan a PPAR α foszforilált állapotának változása eredményezi a receptor aktiválását (Webb és mtsai., 2006). A peroxisóma proliferáció fokozódása és a CYP4A indukciója emberben nem tapasztalható, ennek oka feltehetőleg a PPAR α igen alacsony expressziója összehasonlítva a rácsálókban tapasztalható PPAR α szinttel. Ezen kívül a PPAR α közvetítette jelátvitelhez szükséges apparátus, illetve egyes komponenseinek a hiánya is magyarázhatja a peroxisóma proliferátorok PPAR α keresztül kifejtett hatásának elmaradását emberben (Ripp és mtsai., 2003).

DHEA-nal kezelt patkányokban (0,45 % DHEA tartalmú étrend) Prough és mtsai (1995) megfigyelték, hogy a CYP4A1 mellett a CYP3A23 enzim is indukálódik. Az indukció mechanizmusának felderítéséhez PPAR α génkiütött egereket kezelték DHEA-nal. A DHEA indukálta a Cyp3a11-t, melyből arra következtettek, hogy az indukció feltehetőleg egy másik nukleáris receptor aktiválásán keresztül, a PPAR α -tól függetlenül megy végbe. CV-1 sejteken végzett tranziens transzfekciós vizsgálatok során kimutatták, hogy a 100 μ M-os koncentrációban alkalmazott DHEA aktiválja az egér (2-3-szoros) PXRELUC expresszió emelkedés) és humán (3-4-szeres) PXR-t, mely a Cyp3a11 egér/CYP3A humán ortológ enzimek indukciójához vezet (Ripp és mtsai., 2002). A humán PXR aktiválását már 50 μ M-os DHEA koncentrációt alkalmazva is sikerült elérni, ezzel szemben, az egér PXR-t 100 μ M alatti koncentráció tartományban nem sikerült aktiválni. A vizsgálatok során alkalmazott 50-100 μ M-os DHEA koncentráció megfelel a természetesen előforduló szteroidok, például a pregnánok okozta PXR aktiváláshoz szükséges koncentrációnak. Érdekes módon, a CYP4A és CYP3A23 indukciója mellett, DHEA kezelés hatására patkányban a CYP2C11 szuppresszióját tapasztalták, melynek molekuláris mechanizmusa egyelőre még nem tisztázott (Ripp és mtsai., 2003).

A májban a DHEA metabolizmusa során hidrox- és oxo-származékok képződnek, emberben a fő metabolitok a 7 α / β -OH-, 16 α -OH-, valamint 7-oxo-DHEA (14. ábra) (Fitzpatrick és mtsai., 2001; Michael Miller és mtsai., 2004). Megfigyelések szerint a 7 β -OH-DHEA egyedülállóan csak emberben képződik, melyből arra következtethetünk, hogy a hidroxilezés sztereospecifikusan megy végbe. Robinzon és mtsai (2003) szerint a májban a DHEA először 7 α -OH-DHEA-ná hidroxileződik, majd ez oxidálódik tovább 7-oxo-DHEA-ná (14. ábra). Az oxidálást a 11 β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1 katalizálja. A folyamat megfordítható, a két metabolit folyamatosan egymásba alakul, a 11 β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1 a 7-oxo-DHEA-t redukálva 7 α / β -OH származékokat egyaránt képez. A vesében szintén végbemegy a 7-OH/7-oxo-DHEA átalakulás, azonban a

folyamat ebben az esetben egyirányú és a folyamatot a 11β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 2, valamint 11β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 3 katalizálja.

A DHEA hidroxilezését emberben a CYP3A alcsaládba tartozó enzimek katalizálják. Legnagyobb arányban a CYP3A4/5 vesz részt a metabolizmusban. A felnőtt emberi májban nem, csak magzati májban expresszáldó CYP3A7 is képes a hidroxilezést katalizálni, leginkább a 16α - és 7β -pozícióban. A CYP3A4/5 és CYP3A7 expressziójának nagy egyéni eltérései magyarázhatják a DHEA metabolizmusának nagyfokú interindividuális különbségeit emberben. A DHEAS nem szubsztrátja a P450 enzimeknek, először vissza kell alakulnia DHEA-ná, hogy bekerülhessen az oxidatív metabolizmus folyamatába. Patkány máj mikroszómában a 16α -pozícióban történő hidroxilezést legnagyobb arányban a CYP2D1 katalizálja, a folyamatban emellett részt vesz még a CYP2B1 és a CYP2C11 is. A 7α -OH-DHEA metabolit képződését pedig a CYP3A23 katalizálja. Patkányban megfigyelték, hogy a PXR aktiválásán keresztül CYP3A indukcióval, a DHEA fokozni képes a saját metabolizmusát (Ripp és mtsai., 2002). Látható tehát, hogy a DHEA metabolizmusa és a P450 enzimek részvétele a metabolizmusban faj-specifitást mutat, amely arra hívja fel a figyelmet, hogy mindig számítanunk kell a fennálló faji különbségekből fakadó lehetséges eltérésekre (Michael Miller és mtsai., 2004).

Érdeemes megjegyeznünk, hogy a 7-oxo-DHEA, a DHEA egyik fő metabolitja, az energiaháztartás szabályozásában résztvevő enzimek még hatékonyabb induktorának bizonyult és a DHEA-nal szembeni egyik nagy előnye, hogy nincs androgén aktivitása továbbá nem képződnek belőle ösztrogének sem (Lardy és mtsai., 1995). Ez felveti a DHEA helyett, a 7-oxo-DHEA terápiában történő alkalmazásának lehetőségét.

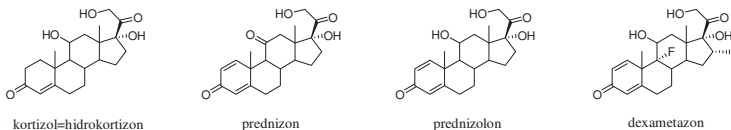
A *de novo* szteroid bioszintézis szigorúan szabályozott folyamat, a szintézis egésze sejt-specifikus, különböző szervekben azon belül is különböző kompartmentumokban zajlik. A DHEA tabletta formában történő szedésekor óhatatlanul beavatkozunk a bioszintézis egyensúlyába, és láttuk azt is, hogy előnyös tulajdonságai mellett, a DHEA káros folyamatokat is indukálhat az emberi szervezetben. További probléma, hogy ezidáig a DHEA hatását többnyire rágcsáló modelleken vizsgálták, kevés humán vonatkozású adat áll rendelkezésünkre és ezek sem mindig összevethetők a rágcsálókön tapasztalt eredményekkel. A DHEA korlátlan fogyasztási lehetősége és az ebben rejlő veszélyek is arra hívják fel a figyelmet, hogy hatásának tanulmányozása, különösen humán modelleken elengedhetetlenül szükséges.

2.5 Dexametazon hatása és alkalmazása

A kortikoszteroidok a *de novo* szteroid bioszintézis során koleszterinből kiindulva szintetizálódnak a mellékvesekéregben (14. ábra). Biológiai hatásuk alapján két nagy csoportra oszthatók, a mineralokortikoidokra (például aldoszteron), valamint a glükokortikoidokra (például kortizol). A mineralokortikoszteroidok a veseműködést befolyásolva az elektrolit- és vízháztartás szabályozásában játszanak szerepet. A vese disztális tubulusaiban a már kiválasztott nátriumionok és a víz újrafelszívódását segítik elő, ugyanakkor megnövelik a káliumion és hidrogénion kiválasztást. A glükokortikoszteroidok a fehérje és szénhidrát anyagcsere szabályzásában vesznek részt, valamint gátolják a gyulladásos folyamatok kialakulását. Hatásukra csökken a fehérjeszintézis és nő a fehérjelebontás az izomzatban (katabolikus hatás), ezáltal növekszik a májban az aminosavak mennyisége és fokozódik az aminosav metabolizáló enzimek aktivitása. A májban fokozódik a glikogéndepozíció, amelynek oka a vércukorszint emelkedés hatására bekövetkező inzulinszekréció növekedés (anabolikus hatás).

A glükokortikoidok gyulladásgátló hatása arra vezethető vissza, hogy a makrokortin inhibitor fehérje képződését váltják ki, mely gátolja a foszfolipáz-A₂ enzim működését. A foszfolipáz A₂ felelős az arachidonsav, membrán foszfolipidekből történő felszabadításáért. A foszfolipáz A₂ gátlása esetén nincs elég szubsztrát a gyulladásos folyamatokban szerepet játszó ciklooxygenáz és lipoxigenáz enzimek számára. A glükokortikoidok az interleukin-2 szintézis gátlásával és a limfocita forgalomra kifejtett általános gátló hatásuk révén is akadályozzák a gyulladásos reakciók kifejlődését. Valamint gátolják még a hisztamin, szerotonin és bradikinin gyulladást elősegítő hatását is (Tőke és Szeghy, 1992).

A mellékvesekéregben termelődő természetes glükokortikoid hormon, a hidrokortizon=kortizol (17. ábra) felfedezése után meginduló szintetikus, glükokortikoid hatású hormon analógok kutatásának és szintézisének célja a gyulladásgátló hatás fokozása és a mineralokortikoid hatás megszüntetése volt. A hidrokortizon első, a gyógyászatban is alkalmazott származékai a prednizon és a prednizolon 4-5-ször hatásosabbak a hidrokortizonnál. A prednizont prodrugként alkalmazzák, aktív metabolitja a prednizolon a májban képződik (17. ábra). A dexametazon, a prednizolon 9 α -fluor-, 16 α -metil-származéka, rendkívül alacsony mineralokortikoid hatást mutat, a szubsztituensek bevitelével a molekula metabolizmusa gátolt, illetve lassul, így körülbelül 4-5-ször hatékonyabbá vált a prednizolonhoz és 20-30-szor a hidrokortizonhoz képest (Tőke és Szeghy, 1992).



17. ábra: A hidrokortizon, prednizon, prednizolon és a dexametazon kémiai szerkezete

A dexametazon számos gyógyszer-készítmény hatóanyaga (Oradexon, Tobradex, Maxidex, Dexapocort N, Doxiproct Plus OM, Dexa-ratiopharm). Gyulladásgátló, antiallergiás, antipiretikus valamint immunszuppresszív hatása ismeretes. Fő terápiás felhasználási területe az autoimmun betegségek köre (rheumatoid arthritis). Ezenkívül számos terápiás alkalmazási módja van még, például perifériás keringési zavarok esetén, sokkállapot során intravénásan gyors glükokortikoid hatás eléréséhez, mellékvesekéreg akut elégtelenség során (Addison-kór) és a szemészetben súlyos akut és krónikus allergiás gyulladásos folyamatok kezelésére használatos.

A dexametazon P450 induktor vegyületként fokozza a P450 gének expresszióját, amely végül emelkedett P450 enzimfehérje szinteket eredményez (Dogra és mtsai., 1998; LeCluyse és mtsai., 2000). A glükokortikoidok, így a dexametazon induktív hatása is, molekuláris szinten két alapvető folyamatból tevődik össze: 1., fiziológiai koncentrációban alkalmazva elsődlegesen a GR aktiválásán, 2., terápiás dózisban alkalmazva pedig a PXR aktiválásán keresztül. A P450 gének közül a CYP1A1, CYP2C9 és a CYP3A4/5 promoterében is megtalálható a GRE, melyhez az aktivált GR kötődni tud. A CYP1A1 intronjában található három GRE szakaszon keresztül a dexametazon modulálja a PAH-vegyületekkel kiváltott CYP1A1 indukciót, mely fajonként eltérő (ld. 20. o.). A dexametazon önmagában nem képes a CYP1A1 transzkripció aktiválására. A szubmikromólos koncentrációban alkalmazott dexametazon a CYP2C9 indukciójához vezet. A dexametazon induktív hatása elsődlegesen a GR aktiválásán keresztül érvényesül. A CYP2C9 transzkripciója a GR szabályozása alatt áll. Azonban a maximális indukció kialakulásához, a CAR és PXR aktiválása is szükséges (ld. 26. o.). A dexametazon hatására kialakuló CYP3A4 indukciója összetett folyamat. Alacsony koncentrációban ($<10^{-7}$ M) alkalmazva a dexametazon a GR-t aktiválja, mely a CYP3A4 promoterében lévő GRE-n keresztül kötődik, és fokozódik a gén átíródása. Nagyobb koncentrációban ($>10^{-6}$ M) a PXR aktiválódik és a PXRE-n keresztül történik a CYP3A4 transzaktiválása. A dexametazon szubmikromólos koncentrációban szabályozza a nukleáris receptorok, így a CAR, PXR és RXR expresszióját, amely közvetett módon hozzájárul a CYP2C, CYP3A és

CYP2B gének szabályzásához (ld. 25. o.). A CYP3A4 maximális indukciója egyszerre több nukleáris receptor aktiválásán (GR, PXR, CAR) keresztül alakul ki (ld. 27. o.)

3 Célkitűzések

Munkánk során a **dexametazon**, egy szintetikus glükokortikoid analóg, valamint egy, a mellékvesekéregben termelődő szteroid típusú hormon, a **DHEA** hatását tanulmányoztuk a gyógyszer-metabolizmusban meghatározó szerepet játszó humán P450 enzimek expressziójára.

- Arra kerestünk választ, hogy
 - a 3-metilkolantrénnel, egy planáris aromás szénhidrogénnel kiváltott CYP1A1 indukció hogyan változik meg **dexametazon** hatására humán és patkány májsejtekben?
 - A humán és patkány CYP1A1 indukálhatóságában bekövetkező változás milyen háttér folyamatoknak köszönhető?
 - Egyéb glükokortikoidoknak milyen hatása van a CYP1A1 indukciójára?
- Továbbá arra kerestünk választ, hogy
 - A táplálékkiegészítőként alkalmazott **DHEA** hogyan befolyásolja a gyógyszer-metabolizmusban résztvevő legfontosabb P450 enzimek, a CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 és CYP2B6 expresszióját?
 - A **DHEA** P450-ekre gyakorolt induktív hatását tapasztalva felmerült a kérdés, hogy a kialakuló induktív hatásnak mi a mechanizmusa, mely nukleáris receptorok játszanak szerepet az indukcióban?
 - Vajon a **DHEA** farmakológiai hatásának megszűnéséhez vezető metabolizmus jelenti-e a P450 indukáló képességének elvesztését is?

4 Anyagok és módszerek

4.1 Vegyszerek

Az 5 α -androsztán-3 β -ol (androsztanol), a dezoxikortikoszteron, a dexametazon, a dikumarol, a dimetil-szulfoxid, az etilénlikol-bis[β -aminoetiléter]-N,N,N',N'-tetraecetsav (EGTA), a 7-etoxirezorufin, a fenacetin, a hidrokortizon, a kortikoszteron, a kortizon, a marha szérum (FCS), a marha szérum albumin, a 3-metilkolantrén, a mifepristone (RU-486), az SR-12813 és a tolbutamid a Sigma-Aldrich Chemie GmbH-től (Steinheim, Németország) származnak. Az 5-androsztén-3 β -ol-17-ont (DHEA), az 5-androsztén-3 β ,7 α -diol-17-ont (7 α -OH-DHEA, OH-DHEA) valamint az 5-androsztén-3 β -ol-7,17-diont (7-oxo-DHEA, oxo-DHEA) a Steraloids Inc.-től (Newport, RI, USA) szereztük be. A TCPOBOP a Bayer AG (Leverkusen, Németország) terméke. Az acetonitril, az ammónium-acetát, a diklórmétán, az etanol, a Folin-Ciocalteu's fenol reagens, az izopropanol, a kálium-klorid, a kloroform, a magnézium-klorid, a metanol, és a nátrium-acetát Merck KGaA (Darmstadt, Németország) termék. A 99-100 %-os ecetsavat (jégecet), a K₂HPO₄-ot, a KH₂PO₄-ot, a kálium-hidroxidot, a NADPH-t, a TRIS-t, a sósavat a Reanal-tól (Budapest, Magyarország) vásároltuk. A glükóz 6-foszfát és a glükóz 6-foszfát dehidrogenáz a Calbiochem, EMD Chemicals Inc.-től (Darmstadt, Németország) származik. A mefenitoint és a nifedipint a Salford Ultrafine Chemicals & Research Ltd.-től (Manchester, Anglia) szereztük be. A 6-(4-klórfeil)imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazol-5-karbaldehyd-*O*-(3,4-diklórbenzil)oxim (CITCO) a BIOMOL Research Laboratories (Plymouth Meeting, PA, USA) terméke. A májsejtek izolálásához és fenntartásához szükséges további vegyszereket a Sigma-Aldrich Chemie GmbH-től (Steinheim, Németország) és a Merck KGaA-tól (Darmstadt, Németország) vásároltuk.

4.2 Primer májsejtek izolálása és fenntartása

A humán májsejteket kadaver májdonorokból két lépéses kollagenázos perfúzióval izoláltuk (Bayliss és Skett, 1996). A májszövetet a Semmelweis Egyetem Transzplantációs és Sebészeti Klinikája (Budapest, Magyarország) bocsátotta rendelkezésünkre. A humán mintákkal végzett vizsgálatokat a Tudományos Kutatási és Etikai Bizottság engedélyezte. A donorkok adatait a 6. és 7. táblázat tartalmazza. A patkány májsejteken végzett kísérleteinkhez ~200 g testsúlyú hím Wistar patkányok májából (ToxiCoop, Budapest, Magyarország) izoláltuk a hepatocytákat.

Első lépésben EGTA kelátképzőt tartalmazó puffert áramoltattunk át a májszöveten, így a Ca^{2+} megkötésével megbontottuk a májsejtek közötti dezmoszomális kapcsolatot. Második lépésben EGTA-t nem tartalmazó pufferrel kimostuk a maradék kelátképzőt, majd kollagenáz és Ca^{2+} hozzáadásával a sejtek közötti kötőszövetes mátrix feloldásával, a sejtek elváltak egymástól, ezáltal kinyerhetővé váltak a májszövetből. A sejtek életképességét tripánkék festéssel ellenőriztük (Berry és mtsai., 1991), a sejt kultúrákhoz csak a 90 % fölötti életképességű sejtpreparátumokat használtuk fel. A sejteket kollagénnel fedett petricsészékbe tettük, a sejtsűrűség $1,7 \times 10^5$ sejt/ cm^2 volt (Ferrini és mtsai., 1998). A sejtek letapadását követően (minimum 4 h, 5 v/v % FCS) a tápfolyadékot (William's medium E: Nutrient mixture F-12 Ham = 1: 1) szérumentesre cseréltük és minden 24-ik órában cseréltük.

A humán májsejtek kezelése a következő módon történt:

1. A CYP1A indukciós vizsgálatok során a sejteket 3-metilklantrénnel (3,7 μM), dexametazonnal (0-10 μM), RU-486-tal (1 és 10 μM) egymagában és kombinálva (3-metilklantrén+dexametazon, 3-metilklantrén+RU-486+dexametazon) kezeltük 24 és 48 órán keresztül. A dexametazonon kívül, egyéb glükokortikoidok hatásának tanulmányozásakor a sejteket 3-metilklantrénnel kombinálva hidrokortizonnal, kortizonnal, kortikoszteronnal, dezoxikortikoszteronnal 1 és 10 μM -os koncentrációban kezeltük (3-metilklantrén+hidrokortizon, 3-metilklantrén+kortizon, 3-metilklantrén+kortikoszteron, 3-metilklantrén+dezoxikortikoszteron).

2. A DHEA okozta indukciós hatás vizsgálata során 48 órás DHEA (50 μM), 7 α -OH-DHEA (50 μM), 7-oxo-DHEA (50 μM), valamint referenciaként dexametazon (1 és 10 μM) kezelést végeztünk. A kezeléseket során az induktorvegyületek oldószereként alkalmazott dimetil-szulfoxid tartalom nem haladta meg a 0,1 v/v %-ot.

A primer egér májsejt izolálás, valamint az egér májsejteken végzett vizsgálatok Prof. U. A. Meyer (Biozentrum, University of Basel, Basel, Svájc) laboratóriumában történtek. Az első CAR knockout, C57BL/6J törzsből származó egér tenyészpár D. D. Moore ajándéka volt (Department of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA) (Wei és mtsai., 2000). A további tenyésztés U. A. Meyer laboratóriumában történt (Biozentrum, University of Basel, Basel, Svájc). A primer egér májsejteket kontroll (CAR+/+), valamint CAR knockout (CAR-/-) egerek májából a 39. oldalon ismertetett kollagenázos perfúzióval izoláltuk (Bayliss és Skett, 1996). A sejteket 3×10^5 sejt/lyuk sejtsűrűség mellett, kollagénnel előkezelt 12 lyukú lemezekre ültettük

(Ferrini és mtsai., 1998). A sejteket androsztanol jelenlétében (0, 1 és 10 μM) illetve androsztanol nélkül TCPOBOP-al (10 μM) és DHEA-nal (25 μM) 24 órán át kezeltük.

6. táblázat: CYP1A1 indukciós vizsgálatok során alkalmazott májszövetek donorjainak adatai

Donorkód	Kor (év)	Nem	Rasz	Halál oka	Alkalmazott gyógyszerek
HH-024	68	férfi	kaukázusi	Subarachnoidális vérzés	ceftriaxone, dopamin
HH-031	58	férfi	kaukázusi	Agyvérzés	dopamin
HH-033	43	nő	kaukázusi	Agyvérzés	mannitol
HH-034	46	nő	kaukázusi	Subarachnoidális vérzés	dopamin
HH-053	47	nő	kaukázusi	Subarachnoidális vérzés	noradrenalin
HH-062	17	nő	kaukázusi	Agyzúzdás	ceftriaxone, dopamin, mannitol

7. táblázat: A DHEA P450-ekre gyakorolt induktív hatásának vizsgálata során alkalmazott májszövetek donorjainak adatai

Donorkód	Kor (év)	Nem	Rasz	Halál oka	Alkalmazott gyógyszerek
HH-075	63	férfi	kaukázusi	Subarachnoidális vérzés	noradrenalin
HH-078	47	nő	kaukázusi	Subarachnoidális vérzés	dopamin, noradrenalin
HH-079	44	nő	kaukázusi	Subarachnoidális vérzés	clindamycin, noradrenalin
HH-080	29	nő	kaukázusi	Subarachnoidális vérzés	ceftriaxone, vancomycin
HH-082	44	férfi	kaukázusi	Stroke	noradrenalin
HH-083	32	nő	kaukázusi	Subdurális vérzés	-
HH-086	39	férfi	kaukázusi	Agyzúzdás	ceftriaxone, noradrenalin, mannitol

4.3 P450 specifikus enzimaktivitás mérések

A sejt kultúrában tartott, kezelt sejteket foszfát pufferes (PBS: 2,68 mM kálium-klorid; 136,7 mM nátrium-klorid; 1,47 mM KH_2PO_4 ; 8,1 mM Na_2HPO_4 , pH=7,4) mosást követően, a kollagén felületről összegyűjtöttük, PBS-ben feldolgozásig -80 °C-on tároltuk. A sejtek ultrahangos feltárása után, differenciál centrifugálással mikroszóma frakciót preparáltunk van der Hoeven és Coon (1974) módszere alapján. A mikroszómák fehérjetartalmát Lowry-szerint (1951) határoztuk meg (a standard: marha szérum albumin). A specifikus enzimaktivitás mérések során a következő, irodalomból ismert módszereket alkalmaztuk: fenacetin O-deetilézés/CYP1A2 (Dislerath és mtsai., 1985), mefenitoin N-demetilézés/CYP2B6 (Heyn és mtsai., 1996), tolbutamid 4-hidroxilezés/CYP2C9 (Miners és Birkett, 1996), mefenitoin 4'-hidroxilezés/CYP2C19 (Srivastava és mtsai., 1991), midazolam 1'- és 4-hidroxilezés/CYP3A4/5 (Kronbach és mtsai., 1989), nifedipin oxidálás/CYP3A4/5 (Guengerich és mtsai., 1986) (18. ábra). Az inkubációs elegy összetétele: NADPH-generáló rendszer (1 mM NADPH, 10 mM glükóz 6-foszfát, 5 mM magnézium-klorid, 2 egység/ml glükóz 6-foszfát dehidrogenáz), humán máj mikroszóma valamint a különböző P450 szelektív szubsztrátok. Az inkubálást 37 °C-on, 0,1 M TRIS/sósav pufferben (pH=7,4) végeztük, kivéve a midazolam 1'- és 4-hidroxilezést és a nifedipin oxidálást, melynek során 100 mM-os foszfát puffert (pH=7,4) alkalmaztunk. A képződő metabolitok mennyiségét HPLC/UV (ELITE, LaChrom, Merck, Németország) detektálással határoztuk meg. A reakciókörülmények és az analízis paramétereit a 8. táblázat tartalmazza részletesen.

A 7-etoxirezorufin O-deetiláz aktivitást intakt májsejteken határoztuk meg (Monostory és Vereczkey, 1996). A sejtek kezelését követően a tápfolyadékot eltávolítottuk, a sejteket Hank-féle pufferrel mostuk, majd 7-etoxirezorufint (5 μM végkoncentráció) és dikumarolt (10 μM végkoncentráció) tartalmazó Hank-féle puffert adtunk a sejtekhez. A dikumarol gátolja a citoszolban jelenlévő diaforáz enzimet, amely a képződő rezorufin továbbalakulását katalizálja. A szubsztrátból képződő rezorufin mennyiségét fluorimetriásan (RF-5301PS spektrofluorofotométer, Shimadzu, Japán) detektáltuk, 550 nm excitációs és 589 emissziós hullámhossz mellett.

A specifikus enzimaktivitás értékeket $\text{pmol}/4 \times 10^6$ sejt/perc- (CYP1A) vagy pmol/mg mikroszomális fehérjetartalom/perc-ben (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4/5) adtuk meg, az eredmények 4-6 donorból izolált májsejt kultúrán elvégzett mérések átlagait \pm szórás mutatják. A kontroll és a kezelt csoportokkal való

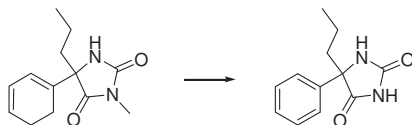
összehasonlítást, valamint a statisztikai elemzést Student-féle t-próbával végeztük, $p < 0,05$ szignifikancia szint mellett.



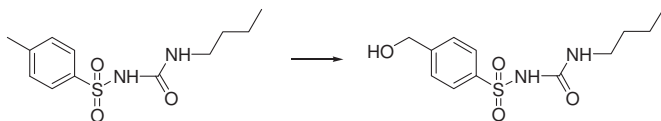
Fenacetin O-deetilézés (CYP1A2)



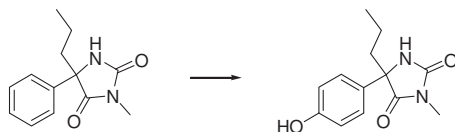
7-etoxizorufin O-deetilézés (CYP1A1/2)



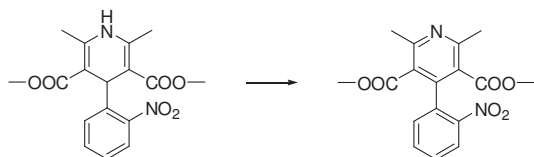
Mefenitoin N-demetilézés (CYP2B6)



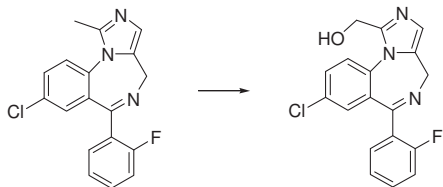
Tolbutamid 4-hidroxilézés (CYP2C9)



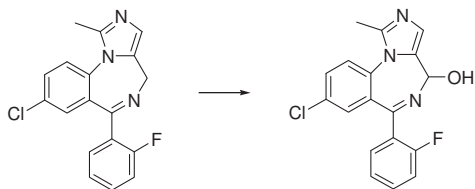
Mefenitoin 4'-hidroxilézés (CYP2C19)



Nifedipin oxidálás (CYP3A4/5)



Midazolam 1'-hidroxilezés (CYP3A4/5)



Midazolam 4-hidroxilezés (CYP3A4/5)

18. ábra: A különböző P450 enzimaktivitások meghatározásához alkalmazott specifikus tesztreakciók

8. táblázat: Az alkalmazott P450 specifikus enzimaktivitás mérések részletesen táblázatba foglalva

	CYP1A2	CYP2B6	CYP2C9	CYP2C19	CYP3A4/5	CYP3A4/5
Alkalmazott szelektív szubsztrát	fenacetin	mefenitoin	tolbutamid	mefenitoin	midazolam	nifedipin
Katalizált reakció megnevezése	fenacetin O-deetilézés	mefenitoin N-demetilézés	tolbutamid 4-hidroxilézés	mefenitoin 4'-hidroxilézés	midazolam 4-hidroxilézés és Midazolam 1'-hidroxilézés	nifedipin oxidálás
Szubsztrát koncentráció (mM)	0,4	1	1	1	0,4	0,4
Mikroszóma fehérjetartalma (mg/ml)	2	2,5	1	2,5	0,8	1,6
Inkubálási idő (perc)	10	20	30	20	10	20
Reakció leállítás	500 µl jéghideg metanol	3x5 ml diklórmétán	200 µl jéghideg metanol	3x5 ml diklórmétán	335 µl jéghideg metanol	335 µl jéghideg metanol
Eluens összetétele	10 % acetonitril 90 % 20 mM ammónium-acetát (pH=6,0)	25 % acetonitril	30 % acetonitril 70 % 10 mM nátrium-acetát/jégecet puffer (pH=4,4)	25 % acetonitril	40 % acetonitril 60 % 50 mM KH ₂ PO ₄ puffer (pH=7,2)	40 % acetonitril 60 % 50 mM KH ₂ PO ₄ puffer (pH=7,2)
Oszlop típusa	LiChrosper RP-18, 5 µm, 125x4 mm (Merck)				Purospher RP-18, 5 µm, 125x4 mm (Merck)	
Detektálási hullámhossz λ (nm)	245	220	230	220	218	208

Táblázat folytatása	CYP1A2	CYP2B6	CYP2C9	CYP2C19	CYP3A4/5	CYP3A4/5
Áramlási sebesség	<u>0-3,9 perc:</u> 100 % eluens 0,8 ml/perc <u>4,0-6,1 perc:</u> 50 % eluens 50 % acetonitril 2 ml/perc <u>6,2-7,8 perc:</u> 100 % eluens 2 ml/perc <u>7,9-8,0 perc:</u> 100 % eluens 0,8 ml/perc	<u>0-7 perc:</u> 100 % eluens 0,8 ml/perc <u>7,2-9,8 perc:</u> 100 % eluens 2 ml/perc <u>10-10,5 perc:</u> 100 % eluens 0,8 ml/perc	<u>0-3,5 perc:</u> 100 % eluens 1 ml/perc <u>3,7-5,0 perc:</u> 50 % eluens 50 % acetonitril 2 ml/perc <u>5,2-6,0 perc:</u> 100 % eluens 2 ml/perc <u>6,2-8,0 perc:</u> 100 % eluens 1 ml/perc	<u>0-7 perc:</u> 100 % eluens 0,8 ml/perc <u>7,2-9,8 perc:</u> 100 % eluens 2 ml/perc <u>10-10,5 perc:</u> 100 % eluens 0,8 ml/perc	<u>0-6,0 perc:</u> 100 % eluens 1 ml/perc <u>6,2-9,0 perc:</u> 100 % eluens 2 ml/perc <u>9,2-9,5 perc:</u> 100 % eluens 1 ml/perc	<u>0-7,0 perc:</u> 100 % eluens 0,6 ml/perc <u>7,3-8,1 perc:</u> 100 % eluens 1,2 ml/perc <u>8,3-9,0 perc:</u> 100 % eluens 0,6 ml/perc

4.4 Western blot analízis

A vizsgálathoz szükséges mikroszóma frakciót a 4.3. pontban leírtak alapján izoláltuk. A májsejtek CYP1A1 fehérje tartalmát Western blot analízissel határoztuk meg, (10 µg fehérjetartalmú mikroszóma/sáv). A kimutatáshoz nyúlban termeltetett anti-patkány CYP1A1-et (primer antitest) (Gentest Co., Woburn, MA, USA), valamint tormaperoxidázzal konjugált, kecskében termeltetett anti-nyúl IgG-t (szekunder antitest) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) használtunk. A reakció során a poliklonális anti-patkány CYP1A1 specifikusan csak a CYP1A1-et ismeri fel, a CYP1A2-t nem, ezáltal elkülöníthető a két fehérje egymástól. A tormaperoxidáz szubsztrátjának a luminolnak a hozzáadásával, a kemilumineszcencia detektálásával fényérzékeny filmen (Amersham Biosciences Trading GmbH, Wien, Ausztria) a reakció láthatóvá tehető. A kvantitatív kiértékelés során a megjelenő sávok intenzitását denzitometriásan a Un-Scan-It-gel 5.1-es verziójú szoftverrel (Silk Scientific Inc., Orem, UT, USA) határoztuk meg.

4.5 RNS izolálás

A mRNS szintek meghatározásához egér és humán májsejtekből RNS-t izoláltunk TRIzol reagenssel (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) a gyártó cég általunk módosított protokolla alapján. 10^7 sejthez 1 ml TRIzol reagenst adtunk, a mintákat 5 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, majd feldolgozásig -80 °C-on tároltuk. A feldolgozás során többszöri folyadék-folyadék extrakciót végeztünk. A lefagyasztott mintákat szobahőmérsékleten hagytuk felolvadni, majd 200 µl kloroform hozzáadása után, a mintákat, 2-3 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, végül 15 percig 10000 x g-n centrifugáltuk (Heraeus, Biofuge Fresco, DJB Labcare, Buckinghamshire, Anglia). A centrifugálást követően a felső fázist átpipettáztuk egy eppendorf csőbe és 500 µl izopropanolt adtunk hozzá, majd egy órán át -80 °C-on fagyasztottuk. A felolvadást követően a mintákat 10 percig 10000 x g-n centrifugáltuk. Centrifugálás után a felülúszót eltávolítottuk és a kivált RNS-t 1 ml 75 %-os etanolban szuszpendáltuk. A szuszpendálást követően a mintákat 5 percig 10000 g-n centrifugáltuk. A felülúszót újból eltávolítottuk, és a mintákat még egyszer mostuk 1 ml 75 %-os etanollal és centrifugáltuk. Végül a felülúszó eltávolítása után az RNS-t levegőn szárítottuk, majd 0,01 v/v % dietil-pirokarbonátot tartalmazó sterilizált desztillált vízben feloldottuk. Az RNS koncentrációját és tisztaságát, Nanodrop 1000 spektrofotométerrel (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE, USA) határoztuk meg.

4.6 Northern blot analízis

A Northern blot analízist a Louisville-i Egyetemen közösen végeztük (Prof. R. A. Prough, Louisville, Kentucky, USA). A 4.5. pontban leírtak alapján izoláltuk az RNS-t, majd sávonként 12 µg RNS-t 1 m/v %-os agaróz/formaldehid denaturáló gélen elektroforézissel szétválasztottunk. A szétválasztott RNS-eket a gélből nejlon membránra (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) vittük át, és a CYP1A1 valamint a β-aktinra specifikus radioaktívan jelölt cDNS próbákkal hibridizáltuk. Ezt követően a filtert mostuk, majd az autoradiográfián alapuló kvantitatív kiértékelést PhosphorImager és ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) szoftverrel végeztük el.

4.7 Kvantitatív RT-PCR

A humán RNS mintákból (3 µg) reverz transzkripcióval egyszálú cDNS-t állítottunk elő Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) felhasználásával. A kvantitatív RT-PCR vizsgálatokhoz (LightCycler 2.0 Real-Time PCR System készülék, Roche Applied Science, Svájc) FastStart *Taq*DNA polimerázt és 0,1 µM-os végkoncentrációjú Universal Probe Library (UPL) próbákat (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) használtunk. Az alkalmazott primerek (TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Németország) végkoncentrációja 0,2 µM volt.

Az egér Cyp2b10 mRNS szintjének meghatározásához (5-karboxifluorescein) FAM-jelölt Taq próbát (Microsynth GmbH, Balgach, Svájc) és AmpliTaq DNA polimerázt (TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) alkalmaztunk. A próbák és primerek szekvenciáját a 9. táblázat tartalmazza. Az adott mRNS szinteket a referenciaként alkalmazott úgynevezett housekeeping gén a GAPDH mRNS szintjéhez viszonyítottuk.

9. táblázat: Az alkalmazott primerek és próbák táblázatos összefoglalása

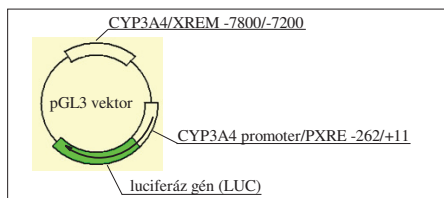
Primerek és próbák	Szekvenciák
Humán	
CYP2B6 forward	5'-AAAGCGGAGTGTGGAGGA-3'
CYP2B6 reverse	5'-AAGGTGGGGTCCATGAGG-3'
CYP2B6 próba	FAM-5'-AGGAGGAG-3'-BHQ
CYP2C9 forward	5'-GTGCACGAGGTCCAGAGATAC-3'
CYP2C9 reverse	5'-CAGGGAAATTAATATGGTTGTGC-3'
CYP2C9 próba	FAM-5'-CTTCTCCC-3'-BHQ
CYP2C19 forward	5'-TGAAGGTGGAAATTTTAAGAAAAGTAA-3'
CYP2C19 reverse	5'-CCCTCTCCACACAAATCC-3'
CYP2C19 próba	FAM-5'-CAGCAGGA-3'-BHQ
CYP3A4 forward	5'-CATGGACTTTTAAAGAAGCTTGG-3'
CYP3A4 reverse	5'-TTCCATGTCAAACATACAAAAGC-3'
CYP3A4 próba	FAM-5'-CTCTGCCT-3'-BHQ
GAPDH forward	5'-AGCCACATCGCTCAGACA-31
GAPDH reverse	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'
GAPDH próba	FAM-5'-TGGGGAAG-3'-BHQ
Egér	
Cyp2b10 forward	5'-CAATGTTTGTAGTGGAGGAAGCTGCG-3'
Cyp2b10 reverse	5'-CACTGGAAGAGGAACGTGGG-3'
Cyp2b10 próba	FAM-5'-CCCAGGGAGCCCCCTGGA-3'-TAMRA
GAPDH forward	5'-CCAGAACATCATCCCTGCATC-3'
GAPDH reverse	5'-GGTCCTCAGTGTAGCCCAAGAT-3'
GAPDH próba	FAM-5'-CCGCCTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3'-TAMRA

Rövidítések: FAM: 5-karboxifluorescein jelölés, 494/518 nm, TAMRA: 5-karboxitetrametilrodamin jelölés, 560/582 nm (excitált/emittált hullámhossz), BHQ: black hole quencher

4.8 Tranziens transzfektálás

A tranziens transzfektálást J.-M. Pascussi laboratóriumával (INSERM, Université Montpellier, Montpellier, Franciaország) együttműködve végeztük. A humán hepatocelluláris karcinóma sejtvonala (HuH7) a European Collection of Cell Cultures-től (ECACC, Salisbury, Egyesült Királyságok) származott, a sejteket kiegészített, Dulbecco's modified Eagle's tápfolyadékban (DMEM) (10 v/v % FCS) tartottuk fent. Az alábbi plazmidokat építettük be a sejtekbe: pSG5, pSG5-hPXR, pGL3(CYP3A4/XREM[-7800/-7200]/-262/+11)LUC (ahol a XREM: -7800/-7200 és a CYP3A4 promotor régió: -262/+11, 21. ábra) és pSV- β -galaktozidáz (Pascussi és mtsai., 2001; 2003/1). A transzfektálás során 5×10^5 HuH7 sejthez 10 ng pSG5 vagy pSG5-hPXR plazmidot, 100 ng a luciferázt is tartalmazó riporter szekvenciát, a pGL3(CYP3A4/XREM[-7800/-7200]/-262/+11)LUC-t (19. ábra), valamint 50 ng pSV- β -galaktozidáz plazmidot (kontroll) használtunk

(FuGENE6, Roche Applied Science, Basel, Svájc). 16 órával a transzfektálást követően a tápfolyadékot megújítottuk és a sejteket DHEA-nal 1, 10 és 50 μM -os koncentrációban, valamint SR-12813-al 1 μM -os koncentrációban kezeltük. Az oldószer (dimetil-szulfoxid) mennyisége a tápfolyadékban nem haladta meg a 0,1 v/v %-ot. 24 órás inkubálást követően a luciferáz és β -galaktozidáz aktivitást az irodalomban leírtak alapján határoztuk meg (Pascussi és mtsai., 2003/1). Az aktivitás értékeket normalizáltuk a luciferáz/ β -galaktozidáz hányados képzésével. Az eredményeket négy elvégzett kísérletből származó, három párhuzamos minta átlagai \pm szórásaként adtuk meg.



19. ábra: A pGL3 vektor felépítése

4.9 Nukleáris transzlokációs vizsgálatok

A nukleáris transzlokációs vizsgálatokat Prof. U. A. Meyer (Biozentrum, University of Basel, Basel, Svájc) laboratóriumával együttműködve végeztük. A vizsgálatokhoz az egér májsejteket kollagénnel bevont fedőlemezekre ültettük. 4 órával a sejtek letapadását követően, a tápfolyadékot szérummentesre cseréltük. A transzfektálást Opti-MEM I Reduced Serum Medium tápfolyadékban Lipofectamine 2000 transzfekciós reagens (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) felhasználásával végeztük, a sejtekbe a pEGFP-cl-hCAR plazmidot építettük be, melyet Prof. M. Negishitől (Laboratory of Reproductive and Developmental Toxicology, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA) kaptunk. 18 órával a transzfektálást követően a sejteket DHEA-nal (50 μM) és CITCO-val (100 nM) 4 órán át kezeltük, majd a sejteket PBS-sel mostuk és 4 m/v %-os paraformaldehiddel fixáltuk. A sejteket 4'-6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI) festettük meg, a fluoreszcens mikroszkópos felvételeket Leica DM5000B típusú mikroszkóppal (Leica Microsystems, Wetzlar GmbH, Németország) készítettük. A felvételek kiértékelését AnalySIS Pro szoftver (SoftImaging System GmbH, Münster, Németország) felhasználásával végeztük.

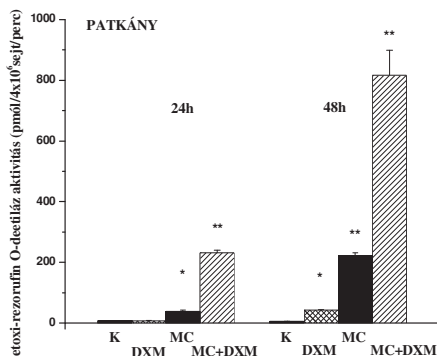
4.10 Kiértékelés és statisztikai elemzés

Az eredményeket minden esetben átlag±szórás adtuk meg, a statisztikai kiértékelést a GraphPad InStat 3.00 verziójú programmal (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) végeztük. A kezeletlen (kontroll) és kezelt csoportok összehasonlítását Student-féle t-próbával, $p < 0,05$ szignifikancia szint mellett végeztük el. Az eredményeinket alátámasztandó, a kísérleteket több donoron (5-6) is elvégeztük, ezt az egyes humán donorok közt meglévő nagy interindividuális különbségek indokolták.

5 Eredmények

5.1 CYP1A indukció patkány májsejtekben

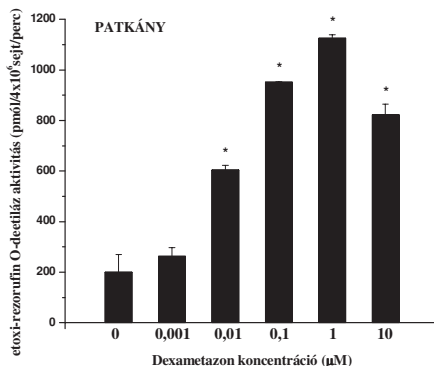
Primer patkány és humán májsejtkultúrában a kezelések során a 3-metilkolantrént 3,7 μM -os koncentrációban alkalmazva elérhető a maximális CYP1A1 indukció. Az irodalomban leírtaknak megfelelően (Sheratt és mtsai., 1989; Silver és mtsai., 1990) a 3-metilkolantrén erős CYP1A induktornak bizonyult. Már a 24 órás 3-metilkolantrén kezelés hatására is nőtt az etoxi-rezorufin O-deetiláz aktivitás, ami a 48 órás 3-metilkolantrénnel kezelt sejtekben tovább fokozódott (körülbelül 5-szörös etoxi-rezorufin O-deetiláz aktivitás növekedést tapasztaltunk a 24 órás kezeléshez viszonyítva (20. ábra)).



20. ábra: Dexametazon hatása a 3-metilkolantrénnel kiváltott CYP1A1 indukciójára patkány májsejtekben. A sejteket 3-metilkolantrénnel (3,7 μM), dexametazonnal (10 μM) egymagában és kombinálva (MC+DXM) kezeltük 24 és 48 órán keresztül. Az aktivitás értékek 3 patkány májából izolált májsejtkultúrán elvégzett kísérletek átlag \pm szórásaként vannak feltüntetve. A kezetlen (kontroll, K) sejtek eredményeihez képest szignifikánsan eltérő eredményeket $p < 0,05$ esetén *-al és $p < 0,001$ esetén **-al jelöltük (rövidítések: DXM: dexametazon, MC: 3-metilkolantrén)

Önmagában a dexametazon csak kismértékben növelte a CYP1A1 aktivitást a kontroll sejtekhez képest (20. ábra) és az induktív hatása a 3-metilkolantrénnel kiváltott maximális indukció mértékétől messze elmaradt. A 3-metilkolantrén okozta CYP1A1 indukciót a dexametazon (MC+DXM kezelés) potenciozta, 3-4-szeres etoxi-rezorufin O-deetiláz aktivitás növekedést figyeltünk meg a csak metilkolantrénnel kezelt sejtekhez

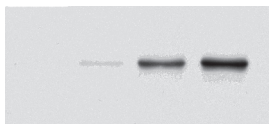
képest. A dexametazon potencírozó hatása már 0,01 μM -os koncentrációnál megfigyelhető, és a maximális hatást 1 μM -os koncentrációnál érték el (21. ábra).



21. ábra: Dexametazon hatása a CYP1A1 indukálhatóságára patkány májsejtekben. A sejteket 3-metilkolantrénnel (3,7 μM) valamint dexametazonnal (0-10 μM) együttesen kezeltük, *: $p < 0,001$

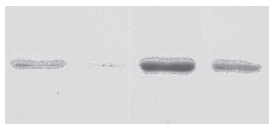
A CYP1A1 enzim fehérje alapszintje nem, illetve alig detektálható, ezt mutatja a 22. A. ábrán a kezeletlen patkány májsejtekből (K) izolált mikroszóma Western blot analízise is. Dexametazon kezelés hatására már kimutatható mennyiségben jelent meg a CYP1A1 enzim fehérje, és 3-metilkolantrén kezelés hatására egy igen erős CYP1A1 fehérje expressziót tapasztaltunk. A 3-metilkolantrén kezelés mellett a dexametazon (MC+DXM) további CYP1A1 fehérje tartalom növekedést eredményezett (3,8-szeres).

A. PATKÁNY



K DXM MC MC+DXM

B. HUMÁN



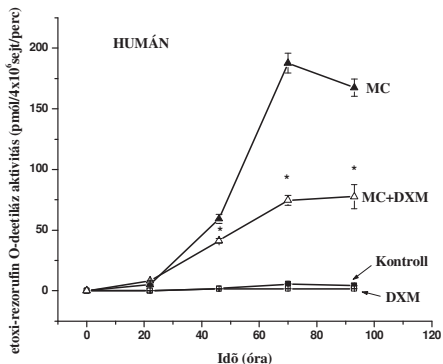
K DXM MC MC+DXM

22. ábra: A kezeletlen (K), a dexametazonnal (10 μM), a 3-metilkolantrénnel (3,7 μM) külön-külön és együttesen kezelt patkány (A.) valamint humán (B., HH-024-es donor) májsejtek Western blot analízissel kimutatott CYP1A1 fehérjetartalma (rövidítések: DXM: dexametazon, MC: 3-metilkolantrén)

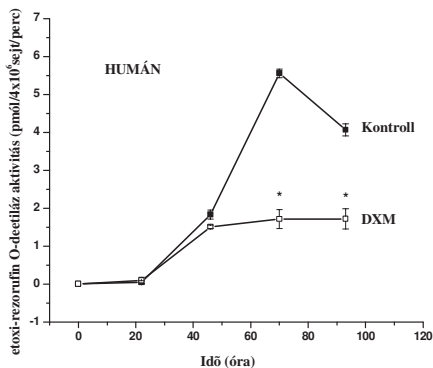
5.2 CYP1A1 expresszió humán májsejtekben

A 23. ábrán a CYP1A1 enzimaktivitás időbeni változása követhető nyomon, 96 órán át fenntartott humán májsejtekben.

A.



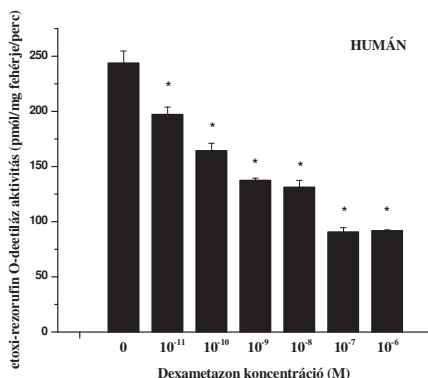
B.



23. ábra: A CYP1A1 3-metilkolantrénnel (3,7 μM) kiváltott indukciójának időbeni változása humán májsejtekben, dexametazon (10 μM) jelenlétében és anélkül. A B. ábra a dexametazonnal (10 μM) kezelt és a kontroll sejtek közti különbséget mutatja, az y tengely kisebb léptékű skálabeosztása mellett. *-al jelöltük a szignifikáns különbségeket a 3-metilkolantrénnel kezelt (A.) és a kontroll (B.) csoporthoz viszonyítva, $p < 0,001$ (rövidítések: DXM: dexametazon, MC: 3-metilkolantrén)

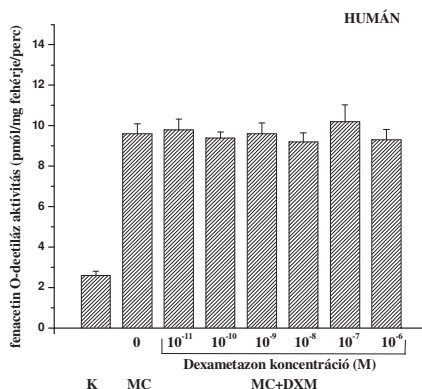
A specifikus CYP1A enzimaktivitás a kontroll sejtekben alacsony volt ugyan, de értékelhető, 0,5-6,0 pmól/4x10⁶sejt/perc közötti, a különböző donoroktól függően. A 3-metilkolantrén erős CYP1A induktív hatást fejtett ki humán májsejtekben is, a maximális induktív hatás esetén a 7-etoxirezorufin O-deetiláz aktivitás értéke a különböző donoroknál 78-203 pmól/4x10⁶sejt/perc tartományba esik, ami a kontroll sejtekhez képest egy 25-30-szoros enzimaktivitás emelkedést jelent. A dexametazon, patkány májsejtekben tapasztalt kismértékű induktív hatásával ellentétben, humán májsejtekben enyhe, de szignifikáns, körülbelül 30-50 %-os CYP1A aktivitás csökkenést figyeltünk meg a kontroll sejtekhez képest (23. B. ábra). A dexametazon a 3-metilkolantrén okozta CYP1A1 indukciót is csökkentette, a MC+DXM együttes kezelés során az etoxi-rezorufin O-deetiláz aktivitás 50-60 %-kal csökkent a 3-metilkolantrén kezeléshez képest (23. A. ábra). A 3-metilkolantrénnel valamint a (MC+DXM)-nal kezelt sejtek aktivitás értékei közti erőteljes különbségek a 72 órás kezelést követően jelennek meg igazán (23. A. ábra).

A dexametazon koncentrációfüggő, a CYP1A1 indukcióra gyakorolt szuppresszív hatását a 24. ábra szemlélteti. A vizsgált 10⁻¹¹ - 10⁻⁶ M-os dexametazon koncentráció tartományban a 3-metilkolantrénnel kiváltott CYP1A1 indukció folyamatos csökkenését tapasztaltuk (a változás szignifikáns), a maximális szuppressziót 10⁻⁷ M-os koncentrációnál értük el.



24. ábra: Dexametazon koncentrációfüggő szuppresszív hatása CYP1A1 indukcióra humán májsejtekben, *: p<0,01

A 7-etoxirezorufin O-deetilézést nemcsak a CYP1A1 enzim katalizálja, hanem a CYP1A2 is részt vesz a katalízis folyamatában mind patkány, mind pedig humán májsejtekben (Burke és mtsai., 1994; Sonnier és Cresteil, 1998; Roymans és mtsai., 2004). A CYP1A2 esetleges részvételének tisztázására egy CYP1A2 szelektív szubsztráttal, a fenacetinnel (Distlerath és mtsai., 1985) meghatároztuk a fenacetin O-deetiláz aktivitást humán májsejtekben (25. ábra). 72 órás 3-metilkolantrén kezelést követően körülbelül 4-szeres CYP1A2 enzimaktivitás emelkedést tapasztaltunk a kontroll sejtek aktivitásához képest, a dexametazon kezelés viszont (10^{-11} – 10^{-6} M) nem okozott semmilyen változást a 3-metilkolantrénnel kiváltott CYP1A2 indukciójában. Még a 10^{-6} M-os koncentrációban történő dexametazon kezelés sem csökkentette a CYP1A2 aktivitást (25. ábra).

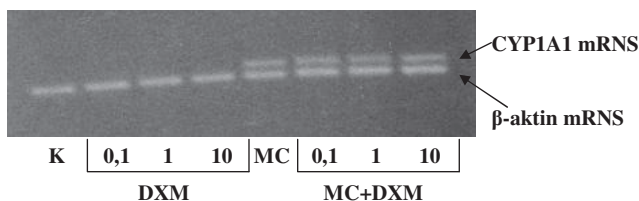


25. ábra: Dexametazon koncentrációfüggő szuppresszív hatásának vizsgálata a CYP1A2 indukcióra humán májsejtekben (rövidítések: K: kontroll, DXM: dexametazon, MC: 3-metilkolantrén)

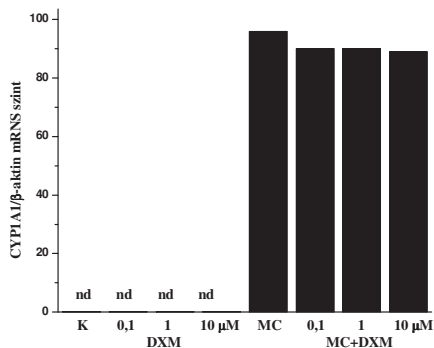
Az etoxi-rezorufin O-deetiláz aktivitás mérések eredményeit alátámasztotta a CYP1A1 fehérje mennyiségének meghatározása is (22. B. ábra, 53. o.). A kontroll sejtek CYP1A1 fehérje tartalma alacsony volt, de kimutatható. A kezetlen sejtek CYP1A1 fehérje tartalmához képest a dexametazon kezelés önmagában csökkentette a CYP1A1 fehérje szintjét. Ezzel ellentétben, 72 órás 3-metilkolantrén kezelés hatására a sejtek CYP1A1 enzim fehérje tartalma jelentősen megnőtt. A MC+DXM együttes kezelés során a 3-metilkolantrénnel kezelt sejtek CYP1A1 fehérje tartalmához képest, a dexametazon körülbelül 50 %-kal csökkentette a CYP1A1 fehérje szintjét.

A CYP1A1 enzim fehérje mennyiségének meghatározása mellett, a CYP1A1 mRNS szintjét is meghatároztuk humán májsejtekben. A Northern blot analízis eredménye alapján (26. A. ábra) elmondható, hogy csak a 3-metilklantrénnel kezelt humán hepatocytákban volt kimutatható mennyiségben jelen a CYP1A1 mRNS. A Western blot analízis eredményével ellentétben, a MC+DXM együttes kezelés során a CYP1A1 mRNS szintje nem változott a csak 3-metilklantrénnel kezelt sejtek mRNS szintjéhez képest. Az oszlopdiagramon ugyanez látható (26. B. ábra) számszerűsítve.

A.



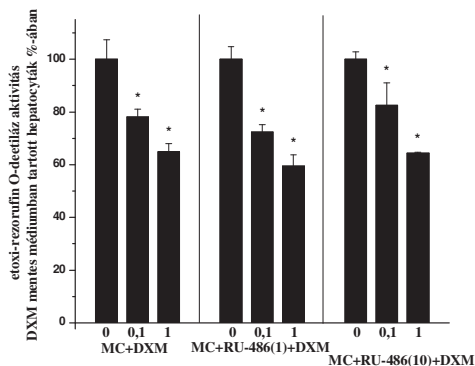
B.



26. ábra: 3-metilklantrén és dexametazon hatása a CYP1A1 mRNS szintjére humán májsejtekben (HH-031-es donor) (A.). A CYP1A1 mRNS szintjét a β-aktin mRNS szintjéhez viszonyítva határoztuk meg. A sejteket 3-metilklantrénnel (3,7 μM) és dexametazonnal (0,1, 1, 10 μM) kezeltük. A Northern blot analízis eredményét mutatja számszerűsítve az oszlopdiagram (nd= nem detektálható) (B.) (rövidítések:

DXM: dexametazon, MC: metilklantrén)

Patkány májsejtekben a glükokortikoid típusú vegyületek, policiklusos aromás szénhidrogénekkal kiváltott CYP1A1 indukciójára gyakorolt szinergista hatása a glükokortikoid receptor aktiválásán keresztül valósul meg, mely végsősoron a CYP1A1 gén transzkripciójának fokozódását eredményezi (Prough és mtsai., 1996; Mathis és mtsai., 1989; Linder és mtsai., 1999). GR antagonistá jelenlétében ez a potencírozó hatás felfüggeszthető (Xiao és mtsai., 1995; Mathis és mtsai., 1986/2). A dexametazon potencírozó hatása a 3-metilkolantrénnel kiváltott CYP1A1 indukciójára patkány májsejtekben a GR-on keresztül valósul meg. Ezzel szemben humán hepatocytákban azt találtuk, hogy a dexametazon csökkentette a 3-metilkolantrén induktív hatását CYP1A1 enzim fehérje szinten, ugyanakkor a CYP1A1 gén átríródását nem befolyásolta. Felmerült a kérdés, hogy a dexametazon vajon közvetlenül fejt-e ki gátló hatását vagy pedig ennek a gátló hatásnak a kialakulásához szükség van a GR-ra? A GR szerepének tisztázására megvizsgáltuk egy erős GR antagonistá, az RU-486 hatását a dexametazon okozta gátlás kialakulására humán májsejtekben (27. ábra).



27. ábra: Az RU-486 hatása a dexametazon okozta CYP1A1 gátlás kialakulására humán májsejtekben. A sejteket 72 órán át kezeltük 3-metilkolantrénnel (3,7 μM), és dexametazonnal (0, 0,1 és 1 μM), valamint RU 486-tal (0, 1, és 10 μM), *: $p < 0,01$ (rövidítések: DXM: dexametazon, MC: 3-metilkolantrén)

A MC+DXM együttes kezelés során, a dexametazon hatására bekövetkező etoxi-rezorufin O-deetiláz aktivitás csökkenést az RU-486 sem 1, sem pedig 10 μM-os koncentrációban alkalmazva nem befolyásolta. Még a két nagyságrenddel nagyobb koncentrációban alkalmazott RU-486 (10 μM) mellett is képes volt a dexametazon (0,1

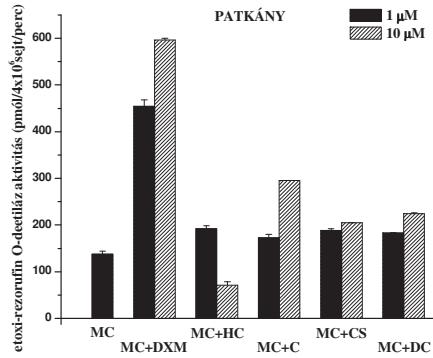
μM) gátolni a 3-metilolantrénnel kiváltott CYP1A1 indukcióját, mely arra enged következtetni, hogy a dexametazon szuppresszív hatása nem a GR-on keresztül valósul meg.

5.3 Egyéb glükokortikoid típusú vegyületek hatása a CYP1A indukciójára

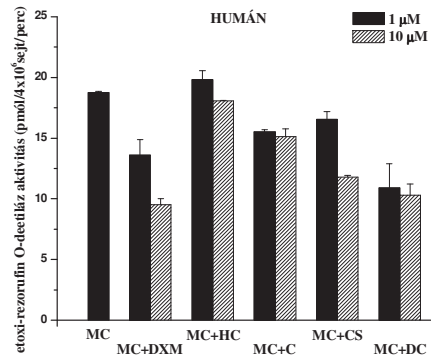
A dexametazon mellett más, glükokortikoid típusú vegyületek (hidrokortizon, kortizon, kortikoszteron, dezoxikortikoszteron) hatását is megvizsgáltuk a 3-metilolantrénnel kiváltott CYP1A1 indukciójára patkány (28. A. ábra) és humán (28. B. ábra) májsejtekben egyaránt. Patkány májsejtekben egyik glükokortikoid sem érte el a dexametazon potencírozó hatásának erősségét, jelentősen a kortizonnal $10\ \mu\text{M}$ -os koncentrációban kezelt sejtekben tapasztaltunk etoxi-rezorufin O-deetiláz aktivitás növekedést (2-szeres).

Humán májsejtekben a dezoxikortikoszteron, a dexametazonhoz hasonló mértékben gátolta a 3-metilolantrén CYP1A1 induktív hatását. A hidrokortizon nem, a kortizon és kortikoszteron csak kis mértékben csökkentette az etoxi-rezorufin O-deetiláz aktivitást a 3-metilolantrénnel kezelt sejtek aktivitásához képest.

A.



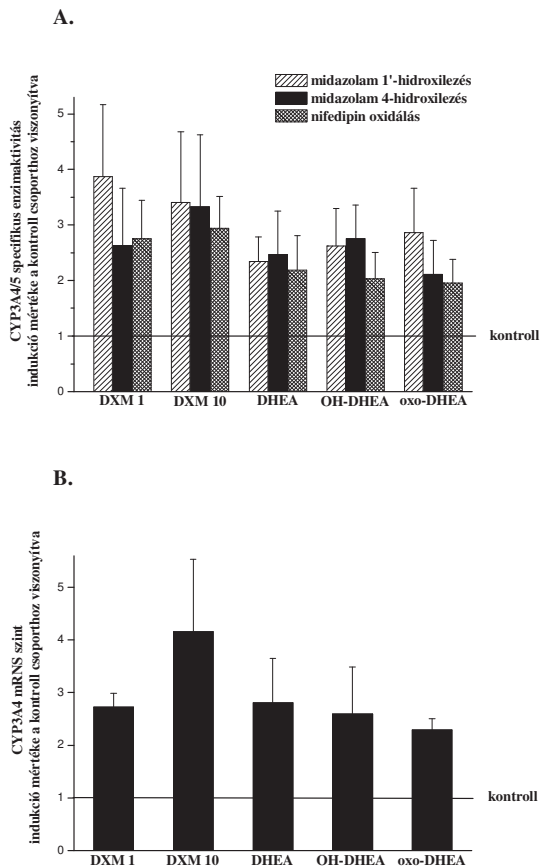
B.



28. ábra: Glükokortikoidok hatása a CYP1A indukciójára patkány (A.) és humán (B.) májsejtekben. A sejteket 3-metilkolantrénnel 3,7 μM-os, valamint a különböző glükokortikoidokkal 1 és 10 μM-os koncentrációban kezeltük (rövidítések: DXM: dexametazon, HC: hidrokortizon, C: kortizon, CS: kortikoszteron, DC: deoxikortikoszteron, MC: 3-metilkolantrén)

5.4 DHEA-nal kiváltott P450 indukció humán májsejtekben

Primer humán májsejtekben a maximális indukció eléréséhez szükséges, 50 μM -os koncentrációt alkalmaztuk, mind a DHEA, mind pedig az OH-DHEA és az oxo-DHEA esetén. Az alkalmazott 50 μM -os koncentráció ember esetén megegyezik az exogén bevitel során kialakuló DHEA terápiás vérszintjével.



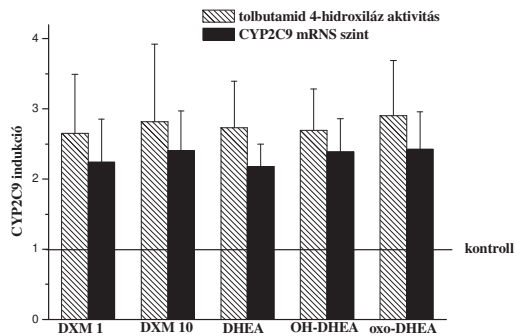
29. ábra: A CYP3A4/5 enzim (A.), valamint a CYP3A4 mRNS (B.) indukciója humán májsejtekben. A sejteket 48 órán át kezeltük dexametazonnal (1 és 10 μM), DHEA-nal (50 μM), 7-OH-DHEA-nal (50 μM) és 7-oxo-DHEA-nal (50 μM). Az eredmények 5 donor májából izolált májsejtkultúrán elvégzett

kísérletek átlag±szórásaként vannak feltüntetve. A kontroll csoport enzimaktivitás értékét és mRNA szintjét 1-nek választottuk és az indukció mértékét ehhez viszonyítottuk (rövidítés: DXM: dexametazon)

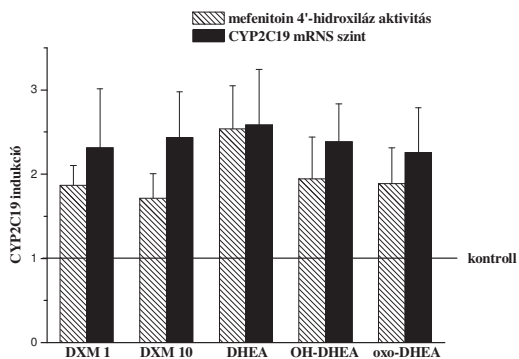
Referencia vegyületként a dexametazont alkalmaztuk (pozitív kontroll) 1 és 10 μM -os koncentrációban. Az irodalomból ismert eredményekkel megegyezően (Ledirac N. de Sousa és mtsai., 2000) a referencia vegyülettel (dexametazon) történő 48 órás kezelést követően, körülbelül 3-4-szeres nifedipin-oxidáz, midazolam 1'- és 4-hidroxiláz aktivitás emelkedést tapasztaltunk (29. A. ábra) a kontroll sejtekhez képest. A DHEA-nal, a OH-DHEA-nal és az oxo-DHEA-nal kezelt sejtekben körülbelül 2-3-szoros specifikus CYP3A4 enzimaktivitás emelkedést találtunk. A CYP3A4 enzimaktivitás értékek emelkedéséhez hasonlóan, a különböző kezelések hatására nőtt a CYP3A4 mRNA szintje is (29. B. ábra). A DHEA és a metabolitjaival történő kezelés közel azonos mértékű (2-3-szoros) enzimaktivitás és mRNA szint emelkedést eredményezett. Ebből következik, hogy a DHEA, a OH-DHEA és az oxo-DHEA fokozni képesek a CYP3A4 gén átíródását.

A DHEA és a két oxidált metabolitja kiváltotta a CYP2C9 indukcióját is (30. A. ábra), a tolbutamid 4-hidroxiláz aktivitás értékének és a CYP2C9 mRNA szintjének emelkedése azonos mértékű volt a dexametazon kezelés során tapasztalt emelkedéssel (2-3-szoros indukció). Hasonló tendenciájú eredményeket kaptunk mind a CYP2C19 (30. B. ábra), mind pedig a CYP2B6 (30. C. ábra) esetén is. A mefenitoin 4'-hidroxiláz aktivitás és a CYP2C19 mRNA szint 2-3-szoros emelkedést mutatott a DHEA, a OH-DHEA és az oxo-DHEA kezeléseket követően. A mefenitoin N-demetiláz enzimaktivitás és CYP2B6 mRNA szint körülbelül 2-2,5-szeres indukcióját tapasztaltuk.

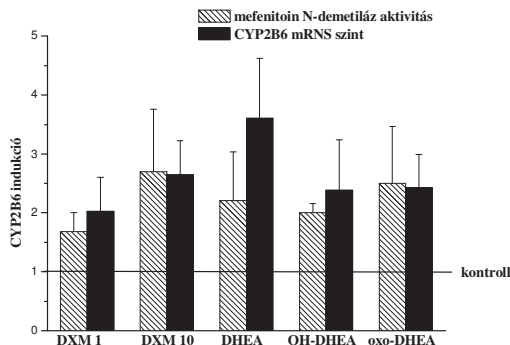
A.



B.



C.

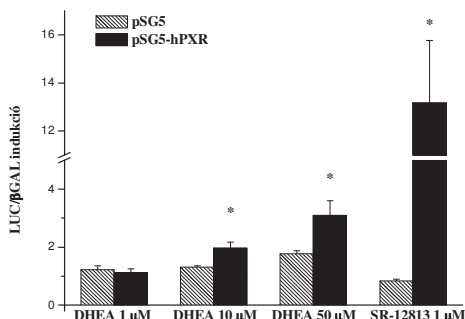


30. ábra: DHEA-nal és metabolitjaival kiváltott CYP2C9 (A.), CYP2C19 (B.), és a CYP2B6 (C.) indukció humán májsejtekben. A sejteket 48 órán át kezeltük dexametazonnal (1 és 10 μ M), DHEA-nal (50 μ M), 7-OH-DHEA-nal (50 μ M) és 7-oxo-DHEA-nal (50 μ M). Az eredmények 6 donor májából izolált májsejtkultúrán elvégzett kísérletek átlag \pm szórásaként vannak feltüntetve. A kontroll csoport enzimaktivitás értékét és mRNS szintjét 1-nek választottuk és az indukció mértékét ehhez viszonyítottuk (rövidítés: DXM: dexametazon)

5.5 Humán PXR aktiválása DHEA-nal

Irodalomból ismert, hogy patkányokban a DHEA kezelés hatással van a P450 gének expressziójára. A DHEA aktiválja a PPAR α -t és a PXR-t (Peters és mtsai., 1996; Ripp és mtsai., 2002), amely a CYP4A és CYP3A23 enzimek indukciójához vezet. Szintén bizonyított, hogy humán májsejtekben számos P450 enzim expressziójának szabályozásában részt vesz a PXR (Pascussi és mtsai., 2001, 2003/2). Az enzimaktivitás és mRNS szint meghatározáson alapuló vizsgálataink eredménye alapján feltételezhető, hogy humán májsejtekben a DHEA, a OH-DHEA, valamint az oxo-DHEA hatására történő P450-ek indukciójában a PXR-nak szerepe van. A PXR szerepének tisztázására (DHEA képes-e aktiválni a receptort) HuH7 sejtvonalon tranzienst transzfekciós vizsgálatokat végeztünk. 24 órás inkubálást követően a DHEA koncentrációfüggően aktiválta a humán PXR-t (a változás szignifikáns), és a maximális aktiválást, ami körülbelül 3-szoros indukciót eredményezett, 50 μ M-os koncentrációnál érték el (31. ábra). Pozitív kontrollként egy jól ismert PXR agonistát, az SR-12813-at alkalmaztuk (Jones és mtsai., 2000), amely a kezelést követően 13-szoros luciferáz aktivitás emelkedést eredményezett.

Meg kell jegyezni, hogy a DHEA kismértékben (1,8-szoros indukció) aktiválta a hPXR nélküli riporter plazmidot is.



31. ábra: hPXR aktiválása DHEA-nal és SR-12813-al (pozitív kontroll, ismert PXR agonista). A sejteket 24 órán át kezeltük DHEA-nal, 1, 10 és 50 µM-os, valamint SR-12813-nal 1 µM-os koncentrációban. 4 kísérlet eredményeinek átlagát±szórását tüntettük fel az ábrán, *: $p < 0,05$

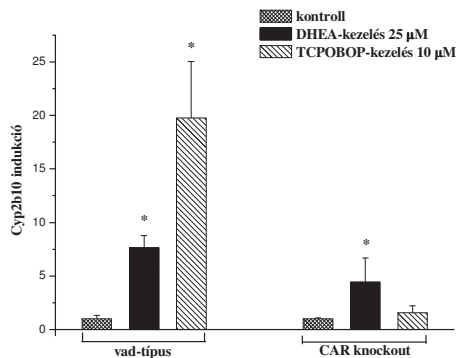
5.6 CAR szerepe a Cyp2b10 indukciójában

5.6.1 DHEA hatására bekövetkező Cyp2b10 indukció vad típusú és CAR knockout egerekből izolált májsejtekben

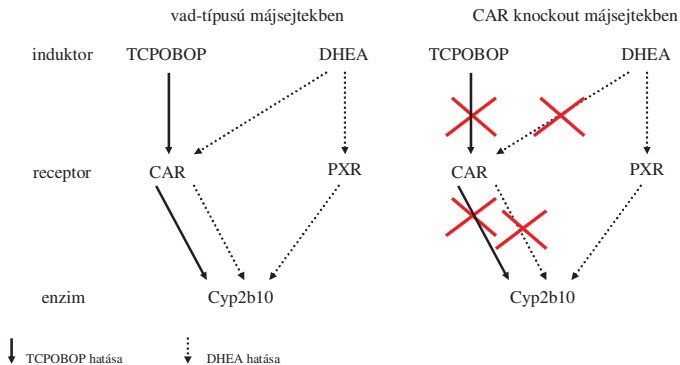
Humán májsejtekben a DHEA CYP2B6-ra kifejtett induktív hatása alapján (30. C. ábra) felvetődött a kérdés, hogy a CAR aktiválásán keresztül történik-e az indukció vagy pedig PXR-közvetített a folyamat. Ennek a kérdésnek a megválaszolásához vad típusú és CAR knockout egerekből izolált májsejteken végeztünk kísérleteket. A vad típusú egerekből izolált májsejtekben a 24 órás DHEA kezelést követően egy igen jelentős, a kontroll sejtek Cyp2b10 (egér ortológja a humán CYP2B6-nak) mRNS szintjétől szignifikánsan eltérő, körülbelül 8-szoros mRNS szint emelkedést tapasztaltunk (32. A. ábra). A TCPOBOP-al, egy nagy affinitású egér CAR aktivátorral történő kezelés hatására a sejtek Cyp2b10 mRNS szintje körülbelül 20-szoros emelkedést mutatott. A CAR knockout egerekből izolált májsejtekben a TCPOBOP induktív hatása a Cyp2b10 expressziójára elmarad. A DHEA-nal kezelt CAR knockout egerekből származó májsejtekben csökkent a Cyp2b10 indukciója, azonban nem szűnik meg teljesen, körülbelül 4-szeres mRNS szint emelkedést figyeltünk meg. Ez rámutat arra, hogy a Cyp2b10

maximális indukciójának eléréséhez szükség van a CAR-ra, továbbá, hogy a CAR-on kívül, a PXR is részt vesz a DHEA induktív hatásának kialakításában (32. B. ábra).

A.



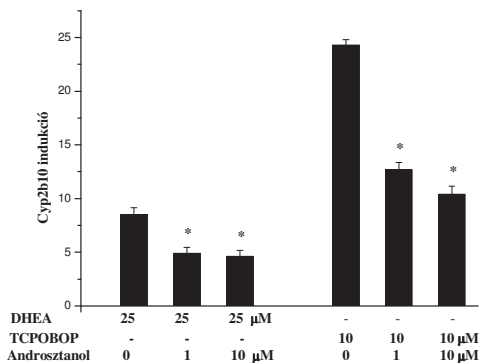
B.



32. ábra: DHEA, valamint TCPOBOP kezelés hatására bekövetkező Cyp2b10 indukció vad típusú és CAR knockout egerekből izolált primer májsejtekben (A.). A sejteket DHEA-nal (25 μ M) és TCPOBOP-al (10 μ M) 24 órán át kezeltük, *: p<0,05. A tapasztalt jelenséget magyarázó sematikus ábra (B.)

5.6.2 Androsztanol hatása a DHEA-nal kiváltott Cyp2b10 indukciójára egér májsejtekben

Az androsztanol, egy inverz egér CAR agonista (Forman és mtsai., 1998) hatását vizsgálva a DHEA-nal kiváltott Cyp2b10 indukciójára egér májsejtekben, újabb bizonyítékot szolgáltatott a CAR részvételére és aktivációjára az indukció folyamatában. Az androsztanol gátolta a Cyp2b10 expresszióját mind a DHEA-nal, mind pedig a TCPOBOP-al kezelt sejtekben (33. ábra). A TCPOBOP-al kezelt sejtek Cyp2b10 mRNS szintje androsztanol hatására körülbelül 50-60 %-kal csökkent. Az androsztanol szintén gátolta a DHEA Cyp2b10 inductív hatását, már 1 μ M-os koncentrációban alkalmazva is szignifikánsan csökkentette a Cyp2b10 mRNS szintjét. Összességében 40-50 %-kal csökkent a Cyp2b10 expressziója, az androsztanol kezelést követően, a DHEA-nal kezelt sejtek Cyp2b10 mRNS szintjéhez képest.

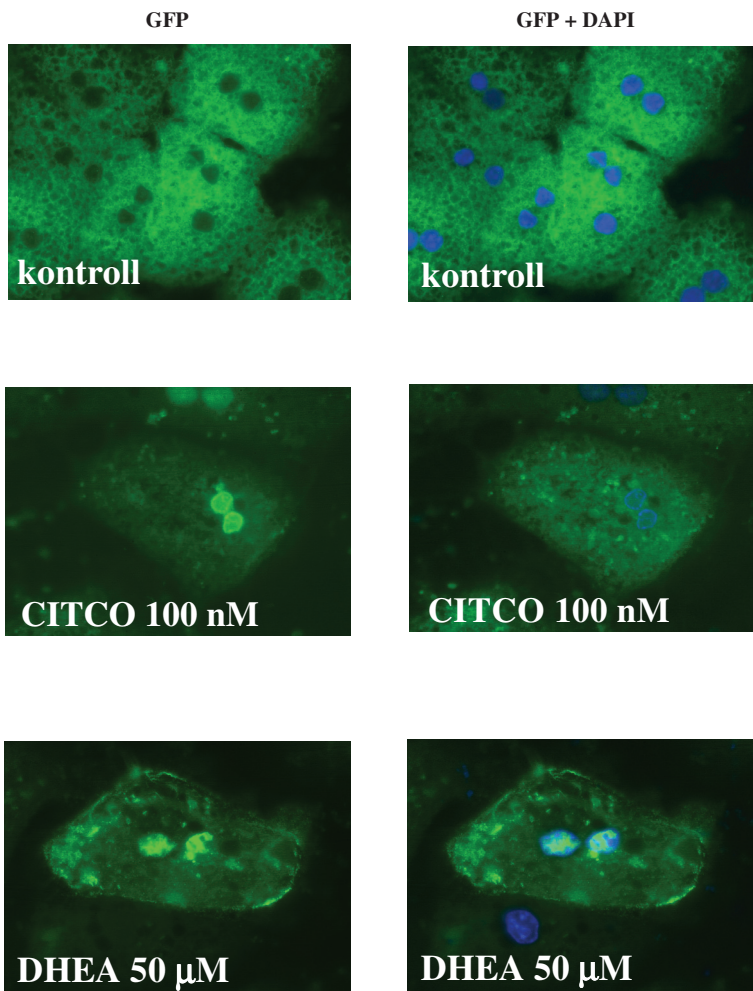


33. ábra: Androsztanol (mCAR inverz agonista) hatása a DHEA-nal és TCPOBOP-al kiváltott Cyp2b10 indukciójára egér májsejtekben, *: $p < 0,05$

5.6.3 Humán CAR transzlokációja a citoplazmából a sejtmagba, DHEA kezelést követően

Humán CAR-t expresszáló primer egér májsejtekben megvizsgáltuk, hogy a DHEA előidézi-e a hCAR transzlokációját a citoplazmából a sejtmagba. A kontroll sejtekben inaktív állapotban a green fluorescent proteinnel (GFP) fuzionáltatott hCAR a citoplazmában helyezkedik el (34. ábra, bal oldali legfelső felvétel). 4 órás CITCO kezelés után (szelektív hCAR agonista, Maglich és mtsai., 2003) a vártan megfelelően, a hCAR a

citoplazmából a sejtmagba vándorol (34. ábra, bal oldali középső felvétel). DHEA kezelés hatására szintén megtörténik a hCAR transzlokációja a citoszolból a sejtmagba (34. ábra, bal oldali legalsó felvétel). A DHEA által előidézett transzlokáció jelenségét még jobban láthatóvá teszi a DAPI-val történő festési módszer, mely a sejtmag megfestését teszi lehetővé (34. ábra, jobb oldali felvétel sorozat).



34. ábra: Fluoreszcens mikroszkópos felvételek a hCAR transzlokációjáról. A primer egér májsejteket GFP-vel fuzionált hCAR-t tartalmazó expressziós vektorral transzfektáltak. Az egér májsejteket 4 órán át kezeltük CITCO-val (100 nM), DHEA-nal (50 μ M) valamint DMSO-val (0,1 v/v%) (kontroll). A sejtmagot DAPI-val festettük meg (rövidítések: DAPI: 4'-6-diamidino-2-fenilindol, GFP: green fluorescent protein, CITCO: 6-(4-klórfenil)imidazo[2,1-b][1,3]tiazol-5-karbaldehyd-O-(3,4-diklórbenzil)oxim))

6 Eredmények értékelése

6.1 Dexametazon hatása a CYP1A1 indukcióra

Előzetes vizsgálatok magzati és újszülött patkány májsejtekben a glükokortikoidok potenciózó hatását igazolták a különböző policiklusos aromás szénhidrogének, mint például az 1,2-benzantracén és a 3-metilklantrén által kiváltott CYP1A1 indukcióra (Mathis és mtsai., 1986/1, 1989; Linder és Prough, 1993; Sheratt és mtsai., 1990). Szintén bizonyított, hogy magzati humán májsejtekben a glükokortikoidok szinergistaként fokozzák a CYP1A1 expresszióját (Mathis és mtsai., 1986/2).

Vizsgálataink tárgya volt, a dexametazon, egy szintetikus glükokortikoid hatása a metilklantrénnel kiváltott CYP1A1 indukciójára felnőttkori humán májsejtekben. Célunk volt továbbá a CYP1A1 expresszió változásának összehasonlítása felnőttkori humán és patkány májsejtekben.

Felnőttkori patkány és humán májsejtekben egyaránt, a 3-metilklantrén potenciálisan indukálta a CYP1A1-et. Az indukció mértéke alapján a 3-metilklantrén erős CYP1A1 induktor vegyület. A dexametazon patkány májsejtekben fokozta a 3-metilklantrén CYP1A1 induktív hatását. Már a 10 nM-os koncentrációban alkalmazott dexametazon is 3-4-szeresére növelte a CYP1A1 indukcióját. A dexametazon potenciózó hatása koncentráció- és időfüggést mutatott, 48 órás kezelést követően az indukció fokozódásának jelensége erőteljesebb a 24 órás kezeléshez képest. A glükokortikoidok szinergista hatásukat a PAH-függő CYP1A1 indukcióra a CYP1A1 gén első intronjában található három glükokortikoid érzékeny szakaszokon keresztül fejtik ki. A glükokortikoid sejtbbe jutásakor aktiválja a GR-t, mely homodimert képezve bejut a sejtmagba, ahol a CYP1A1 GRE szakaszaihoz kötődve fokozza a célgén átíródását, mely végül az endoplazmás retikulumban emelkedett CYP1A1 enzim fehérje szintet eredményez. Ez a molekuláris mechanizmus magzati patkány és humán májsejtekben igen jól ismert és jellemzett (Mathis és mtsai., 1986/1, 1986/2).

Felnőtt donorokból származó humán májsejtekben a 3-metilklantrén kezelés hatására bekövetkező CYP1A1 gén transzkripciójának fokozódásával a CYP1A1 mRNS szintje megnő, azonban a patkány májsejtekben tapasztaltakkal ellentétben, humán májsejtekben dexametazon hatására nem történt további CYP1A1 transzkripció fokozódás. Annak ellenére tehát, hogy a humán CYP1A1 gén is tartalmazza a GRE szakaszokat, dexametazon jelenlétében transzkripció szinten nem változott a 3-metilklantrén CYP1A1

induktív hatása. Brake és mtsai (1998) szerint primer patkány emlő fibroblaszt sejtekben az AhR expresszióját a dexametazon gátolja. Humán májsejtekben ha hasonló mechanizmust feltételezünk, az AhR mennyisége még így is elegendő ahhoz, hogy a 3-metilkolantrénnel kiváltott maximális CYP1A1 indukció megmaradjon és valószínűleg ezért nem tapasztaltunk dexametazon hatására változást a CYP1A1 mRNS szintjében. Ugyanakkor a CYP1A1 enzim fehérje szintjét a 3-metilkolantrénnel kezelt sejtek fehérje szintjéhez képest a dexametazon csökkentette. A MC+DXM-nal kezelt sejtek etoxi-rezorufin O-deetiláz aktivitása 50-60 %-kal csökkent a csak 3-metilkolantrénnel kezelt sejtek CYP1A1 aktivitásához képest. A dexametazon gátló hatása koncentrációfüggést mutatott, már 0,01 nM-os koncentrációban alkalmazva is képes volt szignifikánsan csökkenteni a CYP1A1 aktivitását és 0,1 μ M-os koncentrációban alkalmazva elértük a maximális szuppresszív hatást. MC+DXM kezelést követően a CYP1A1 enzim fehérje mennyiségének és a CYP1A1 specifikus enzimaktivitás értékének csökkenéséből arra következtethetünk, hogy a CYP1A1 fehérje szintet a transzláció sebessége, vagy a fehérje stabilitása szabja meg. A dexametazon CYP1A1 indukciót csökkentő hatását a CYP1A1 enzim *de novo* szintézisének gátlása vagy a CYP1A1 fehérje gyorsabb degradációja is magyarázhatja.

A dexametazon szuppresszív hatása az etoxi-rezorufin O-deetiláz aktivitásra a GR antagonistá, az RU-486 jelenlétében sem szűnt meg humán májsejtekben. A GR-nak tehát nincs szerepe a dexametazon által kiváltott gátló hatás kialakulásában. Fontos megjegyeznünk, hogy a dexametazon okozta etoxi-rezorufin O-deetiláz aktivitás csökkenés, a CYP1A1 enzim fehérje tartalom csökkenésének következtében alakul ki. A 3-metilkolantrén szintén induktív hatású a CYP1A2 aktivitásra, ugyanakkor a dexametazon ezt a kialakuló induktív hatást nem befolyásolta.

A hidrokortizon, kortizon, kortikoszteron és dezoxikortikoszteron esetleges CYP1A1 indukció moduláló hatásának vizsgálatakor egyik glükokortikoid sem bizonyult olyan hatásosnak, mint a dexametazon, sem patkány, sem pedig humán májsejtekben. Patkány májsejtekben a kortizonnal 10 μ M-os koncentrációban kezelt sejtekben egy 2-szeres etoxi-rezorufin O-deetiláz aktivitás növekedést tapasztaltunk, azonban ez sem érte el a dexametazon potencírozó hatásának erősségét a 3-metilkolantrénnel kiváltott CYP1A1 indukcióra. Humán májsejtekben, a dexametazonhoz képest, csak a dezoxikortikoszteron gátolta hasonló mértékben a 3-metilkolantrén CYP1A1 induktív hatását.

Eredményeinket összevetve, fontos megjegyeznünk, hogy a dexametazon a 3-metilkolantrén hatására létrejövő CYP1A1 indukcióra másképpen hat humán és

másképpen patkány májsejteken. Ez arra hívja fel a figyelmet, hogy igen körütekintően kell eljárunk a patkány májsejteken végzett kísérletek eredményeiből a humán májsejteken végzett kísérletek várható eredményeinek becslése során. Figyelembe kell vennünk az esetlegesen faji eltérésekből fakadó eltérő hatások kialakulásának lehetőségét.

6.2 DHEA-nal kiváltott P450 indukció humán májsejteken

Patkány májsejteken a DHEA kezelés számos P450 gén expresszióját befolyásolja. Például a DHEA indukálja a CYP4A-t (Prough és mtsai., 1994) és a CYP3A23-t (Singleton és mtsai., 1999), ugyanakkor a CYP2C11 expresszióját gátolja (Ripp és mtsai., 2003). Patkányokban a DHEA a PPAR α és a PXR aktiválásán keresztül fejti ki inductív hatását (Peters és mtsai., 1996; Ripp és mtsai., 2002). Továbbá az anyavegyülethez hasonlóan a 7-es pozícióban oxidált DHEA metabolitok is fokozzák a CYP4A1 gén expresszióját valamint növelik a CYP4A1 enzim fehérje szintjét (Webb és mtsai., 1996). Munkánk során primer humán májsejteken a DHEA és két fő metabolitjának a 7 α -OH- és a 7-oxo-DHEA-nak a P450 gének expressziójára gyakorolt hatását, továbbá a kialakuló inductív hatás mechanizmusának vizsgálata során a PXR, CAR nukleáris receptorok szerepét vizsgáltuk.

A humán hepatocytákban referencia vegyületként alkalmazott, klasszikus P450 induktor a dexametazon (1 és 10 μ M), a vártan megfelelően növelte a CYP3A4 enzimaktivitását és a CYP3A4 mRNS szintjét. Kisebb mértékben ugyan, de a CYP2C9, CYP2C19 és CYP2B6 expresszióját is fokozta. Az irodalomban közölt eredményekkel (Ledirac N. de Sousa és mtsai., 2000) azonos tapasztalataink egyben biztosítékot szolgáltatottak arra, hogy a kialakított májsejt modell P450 indukciós vizsgálatokra alkalmas.

A DHEA és metabolitjaival történő kezelés hatására a sejtekben fokozódott a CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 és CYP2B6 gének expressziója és nőtt ezen enzimek aktivitása (35. ábra). Ez arra hívja fel a figyelmet, hogy a DHEA metabolizmusa során képződő metabolitok is P450 induktor vegyületek, tehát a biotranszformáció nem vezet a DHEA induktorvegyületként történő inaktiválásához. A DHEA potenciális indukáló hatása a CYP3A4-re humán májsejteken megegyezik a patkányban kialakuló hatással (Singleton és mtsai., 1999). Patkány májsejteken ismert, hogy a DHEA kezelés a CYP2C11 szuppressziójához vezet (Ripp és mtsai., 2003), ezzel szemben humán májsejteken a CYP2C9 és a CYP2C19 indukcióját tapasztaltuk.

A nukleáris receptorok szerepének vizsgálatok megállapítottuk, hogy a DHEA koncentrációfüggően aktiválta a hPXR-t. Ebből arra következtethetünk, hogy a DHEA-nal

kiváltott CYP3A4, CYP2C9 és CYP2C19 indukcióban szerepe van a hPXR-nak. Ugyanakkor a jól ismert hPXR agonista, az SR-12813 aktiváló hatásához képest, a DHEA gyenge hPXR aktivátornak bizonyult.

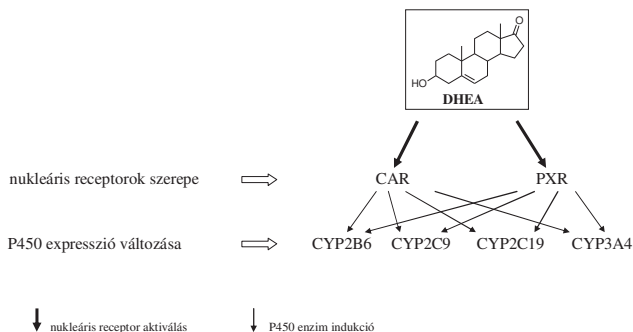
Elsőként vizsgáltuk és írtuk le a DHEA induktív hatását a CYP2B6-ra humán májsejtekben. CAR knockout egerekből izolált májsejtekben, melyekben a CAR nem fejeződik ki, a DHEA által kiváltott Cyp2b10 indukció csökkenését tapasztaltuk ugyan, de érdekes módon az induktív hatás nem szűnt meg teljesen. Ez azzal magyarázható, hogy a sejtekben a CAR nem, de a PXR expresszálódik és a DHEA aktiválni képes. A Cyp2b10 maximális indukciója tehát a CAR és a PXR aktiválásán keresztül valósul meg és a maximális indukció eléréséhez szükség van a CAR-ra. Azonban nem zárható ki egyelőre még ismeretlen transzkripciósfaktorok illetve más nukleáris receptorok szerepe sem.

Újabb bizonyíték még a CAR aktiválására, hogy egér májsejtekben a DHEA hatására létrejövő, CAR közvetítte Cyp2b10 indukciót az androsztanol (inverz egér CAR agonista) felfüggeszti. Abból, hogy az androsztanol a DHEA Cyp2b10-re gyakorolt induktív hatását felfüggeszti, arra következtethetünk, hogy inverz agonistaként leszorítja a DHEA-t a CAR-ról, és így fejt ki gátló hatását a Cyp2b10 gén expresszióra. Ez bizonyítja, hogy a CAR aktiválásához a DHEA-nak közvetlenül, ligandként kötődnie kell a receptorhoz, tehát a CAR aktiválása ligandfüggő mechanizmussal megy végbe.

A különböző, jól ismert CAR aktivátorok sejtbe jutásakor, ilyenek például a fenobarbitál, CITCO, TCPOBOP, a ligand közvetlenül (CITCO, TCPOBOP) vagy szignál transzdukcióval (fenobarbitál) aktiválja a CAR-t, mely az RXR-ral heterodimert képezve bejut a sejtmagba. Ezután a dimer a cél gén promóter régiójában található xenobiotikum érzékeny szakaszokhoz kötődve modulálja az adott gén transzkripcióját. Ebben a folyamatban a CAR sejtmagba történő transzlokációja a meghatározó lépés (Waxman, 1999). Maglich-ék (2003) tapasztalataival összhangban, CITCO kezelést követően a hCAR transzlokációja a citoplazmából a sejtmagba a fluoreszcens mikroszkópos felvételeinken jól nyomon követhető. DHEA kezelés hatására a hCAR szintén transzlokálódik, mely egyértelműen bizonyítja a DHEA CAR aktiváló hatását.

Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy humán májsejtekben a DHEA a PXR-on és CAR-on keresztül fejt ki induktív hatását a CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 és CYP2B6-ra (35. ábra). A DHEA receptorfüggő (PXR, CAR) aktiválással módosítja a CYP gének expresszióját, mely befolyásolja a szervezetbe kerülő xenobiotikumok metabolizmusát, továbbá fontos szerepe lehet a kialakuló gyógyszer-interakciókban.

A DHEA igen népszerű étrendkiegészítő, könnyen beszerezhető és korlátlanul fogyasztható. Elsősorban az idősek, valamint a fiatal sportolók, különösen a testépítők körében „hódít”. Azonban jótékony hatásai mellett bizonyítottuk, hogy terápiás dózisban (25-50 mg/nap) indukálja a gyógyszer-metabolizmusban résztvevő legfontosabb P450 enzimeket, mely veszélyeket rejthet magában. Idős embereknel például, akik gyakran többféle gyógyszert szednek egyszerre és esetleg étrendkiegészítésként DHEA-t is, a DHEA induktív hatása miatt megnövekvő P450 enzimek mennyisége miatt a gyógyszerek terápiás dózísának növelése szükséges, ami végül fokozhatja a gyógyszer-interakciók kialakulását.



35. ábra: A DHEA vizsgált hatásának összefoglaló ábrája

7 Következtetések

7.1 Dexametazon hatása a 3-metilkolantrénnel kiváltott CYP1A1 indukcióra

- Mind patkány, mind humán májsejtekben a 3-metilkolantrén indukálta a CYP1A1-et.
- Patkány májsejtekben a 3-metilkolantrén okozta CYP1A1 indukciót a dexametazon potenciórozta.
- A dexametazon potenciózó hatása a 3-metilkolantrénnel kiváltott CYP1A1 indukciójára patkány májsejtekben koncentrációfüggést mutatott.
- A dexametazon, patkány májsejtekkel ellentétben, humán májsejtekben CYP1A1 aktivitás csökkenést okozott.
- Humán hepatocytákban a dexametazon csökkentette a 3-metilkolantrén induktív hatását CYP1A1 enzim fehérje szinten, ugyanakkor a CYP1A1 gén átíródását nem befolyásolta.
- A 3-metilkolantrén szintén induktív hatású a CYP1A2 aktivitásra humán májsejtekben, ugyanakkor a dexametazon ezt a kialakuló induktív hatást nem befolyásolta.
- A dexametazon szuppresszív hatása a 3-metilkolantrénnel kiváltott CYP1A1 indukciójára koncentrációfüggést mutat humán májsejtekben. A vizsgált 10^{-11} - 10^{-6} M-os dexametazon koncentráció tartományban a 3-metilkolantrénnel kiváltott CYP1A1 indukció folyamatos csökkenését tapasztaltuk és a maximális repressziót 10^{-7} M-os koncentrációnál érték el.
- A dexametazon gátló hatását a 3-metilkolantrén által kiváltott CYP1A1 indukciójára, az RU-486, egy erős GR antagonistá nem függesztette fel humán májsejtekben. A dexametazon szuppresszív hatása tehát nem a GR-on keresztül valósul meg.
- Patkány májsejtekben egyik vizsgált glükokortikoid sem érte el a dexametazon potenciózó hatásának erősségét.
- Humán májsejtekben a dezoxikortikoszteron, a dexametazonhoz hasonló mértékben gátolta a 3-metilkolantrén CYP1A1 induktív hatását. A hidrokortizon nem, a kortizon és kortikoszteron csak kis mértékben csökkentette a CYP1A1 aktivitást a 3-metilkolantrénnel kezelt sejtek aktivitásához képest.

7.2 DHEA-nal kiváltott P450 indukció humán májsejtekben

P450 indukciós vizsgálataink eredményeinek összefoglalása

- Humán májsejtekben DHEA kezelés hatására fokozódott a CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 és CYP2B6 gének expressziója és nőtt ezen enzimek aktivitása. Az indukció mértéke 2-3-szoros a kontroll sejtekhez képest.
- Patkány májsejtekben a DHEA gátolja a CYP2C11-et, ezzel szemben humán májsejtekben a CYP2C9 és CYP2C19 indukcióját tapasztaltuk.
- Elsőként vizsgáltuk és írtuk le a DHEA induktív hatását a CYP2B6-ra humán májsejtekben.
- A DHEA metabolizmusa során képződő metabolitok (7 α -OH-DHEA, 7-oxo-DHEA) is P450 induktor vegyületek, a biotranszformáció nem vezet a DHEA induktorvegyületként történő inaktiválásához. A DHEA metabolizmusa tehát nem szünteti meg az indukálóképességet.

Nukleáris receptorok szerepének vizsgálata a P450-ek indukciójában

- Humán májsejtekben a DHEA a PXR-on és CAR-on keresztül fejt ki induktív hatását a CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 és CYP2B6 génekre.
 - A DHEA koncentrációfüggően aktiválta a humán PXR-t.
 - Elsőként igazoltuk, hogy a DHEA által kiváltott CYP2B6 indukciójában a CAR-nak szerepe van.
 - A DHEA hatására létrejövő, CAR közvetítette Cyp2b10 indukciót az androsztanol egy inverz mCAR agonista felfüggeszti. Az androsztanol mCAR inverz agonista hatására létrejövő Cyp2b10 indukció csökkenése bizonyítja, hogy a DHEA közvetlenül kötődik a CAR-hoz, és ligandfüggő receptor aktiválással fejt ki induktív hatását.
 - DHEA kezelés hatására a humán CAR a citoplazmából a sejtmagba lép, mely egyértelműen bizonyítja a DHEA aktiváló hatását a humán CAR-ra nézve.
- A DHEA receptorfüggő (PXR, CAR) aktiválással módosítja a P450 gének expresszióját, mely befolyásolja a szervezetbe kerülő xenobiotikumok metabolizmusát, továbbá fontos szerepe lehet a kialakuló gyógyszer-interakciókban.

8 Összefoglalás

A dexametazon patkány májsejtekben a 3-metilkolantrén hatására bekövetkező CYP1A1 indukciót szinergistaként fokozta, megnövelve a CYP1A1 mRNS és enzimfehérje szintjét. A CYP1A1 indukció, már igen kis koncentrációban jelenlévő dexametazon (10 nM) hatására is 3-4-szeresére fokozódott. A 3-metilkolantrén hatására bekövetkező CYP1A1 indukció az AhR aktiválásán keresztül valósul meg. A dexametazon potencírozó hatása a GR aktiválásán keresztül történik, mely a CYP1A1 gén promotor régiójában lévő GRE szakaszokhoz kötődve fokozni képes a gén transzkripcióját. Ezzel ellentétben humán májsejtekben a dexametazon koncentrációfüggően, 50-60 %-kal csökkentette a CYP1A aktivitását és a CYP1A1 enzimfehérje szintjét, ugyanakkor nem befolyásolta a CYP1A1 mRNS mennyiségét. A maximális repressziót 0,1 μ M-os dexametazon koncentráció mellett érték el. A dexametazon gátló hatását, az RU-486, egy GR antagonistá adása sem függesztette fel, bizonyítékot szolgáltatva ezzel, hogy a GR-nak nincs szerepe a dexametazon által kiváltott CYP1A1 indukció gátlásában. Az enzimfehérje szint csökkenése a CYP1A1 fehérje fokozódó degradációjával, vagy a CYP1A1 enzimfehérje *de novo* szintézisének gátlásával magyarázható.

DHEA és metabolitjaival (7 α -OH-DHEA, 7-oxo-DHEA) történő kezelés hatására humán májsejtekben fokozódott a CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 gének expressziója és nőtt ezen enzimek aktivitása. Ez arra hívja fel a figyelmet, hogy a DHEA metabolizmusa során képződő metabolitok is P450 induktor vegyületek, tehát a biotranszformáció nem vezet a DHEA, mint P450 induktorként történő inaktiváláshoz. A tapasztalt P450 enzim indukció mechanizmusának feltérképezése során tranziens transzfekciós vizsgálataink kimutatták, hogy a DHEA koncentráció-függően aktiválja a humán PXR-t. Elsőként igazoltuk, hogy a DHEA által kiváltott CYP2B6 indukció, a CAR aktiválásán keresztül történik. Kísérleteink során azt találtuk, hogy az egér Cyp2b10 maximális indukciójának eléréséhez szükség van a CAR-ra. A CAR közvetítette Cyp2b10 indukciót az androsztanol (inverz egér CAR agonista) felfüggeszti, mely többek közt bizonyítja azt is, hogy a DHEA közvetlenül kötődik a CAR-hoz. További bizonyíték még a CAR aktiválására, hogy DHEA kezelés hatására a CAR a citoszolból a sejtmagba vándorol. Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy humán májsejtekben a DHEA a PXR-on és CAR-on keresztül fejti ki inductív hatását a CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 enzimekre. A DHEA receptorfüggő (PXR, CAR) aktiválással módosítja a CYP gének expresszióját, mely befolyásolja a szervezetbe kerülő xenobiotikumok metabolizmusát, továbbá fontos szerepe lehet a kialakuló gyógyszer-interakciókban.

9 Summary

In rat hepatocytes the synthetic glucocorticoid, dexamethasone potentiates the induction of CYP1A1 by 3-methylcholanthrene 3- to 4-fold at as low concentration as 10 nM by increasing mRNA and protein level of CYP1A1. The induction of CYP1A1 by 3-methylcholanthrene requires activation of AhR. The potentiating effect of dexamethasone on CYP1A1 induction is GR-mediated, it is activated by dexamethasone and binds to the GREs in the rat CYP1A1 gene within the promoter region. In contrast, in human hepatocytes, dexamethasone reduces CYP1A1 activity and CYP1A1 induction by 50-60 % at enzyme protein level in a concentration-dependent manner, while it has no effect on CYP1A1 mRNA amount. The maximal suppression of CYP1A1 induction was observed at 0.1 μ M dexamethasone concentration. A strong GR antagonist, RU-486 had no effect on the modulation of CYP1A1 activity caused by dexamethasone, suggesting that GR does not play any role in mediating suppression by dexamethasone. The faster degradation of CYP1A1 protein or inhibition of *de novo* synthesis of CYP1A1 enzyme by dexamethasone might explain the decreased CYP1A1 enzyme protein level.

Treatments of human hepatocytes with DHEA and two of its metabolites (7 α -OH-DHEA, 7-oxo-DHEA) elevated the expression and activities of CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4. Thus biotransformation does not lead to the inactivation of DHEA as a P450 inducer. Transient transfection assays have shown that DHEA is able to activate human PXR in a concentration-dependent manner. We proved first the role of CAR in CYP2B6 induction by demonstrating that CAR is required for maximal induction of mouse Cyp2b10 by DHEA. The CAR-mediated Cyp2b10 induction by DHEA was inhibited by androstanol an inverse agonist of CAR. Further evidence for CAR activation is the nuclear translocation of CAR upon treatment with DHEA. We provide evidence for induction of CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4 through the activation of human PXR and human CAR by DHEA. Elucidation of CAR activation and subsequent induction of CYP2B6 by DHEA presented an additional mechanism by which DHEA can modify the expression of P450s. The effect of DHEA on the activation of xenosensors, PXR and CAR and the consequent potential for adverse drug interactions should be considered in humans treated with this nutraceutical agent.

Köszönetnyilvánítás

- Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Monostory Katalinnak, aki nemcsak szakmailag hanem emberileg is mindig támogatott, munkámat mindvégig figyelemmel kísérte, ötleteivel, tanácsaival segítette előrehaladásomat és megtanított kutatóként gondolkodni.
- Köszönettel tartozom Dr. Pálincás Gábornak és Dr. Hajós Györgynek, hogy doktori képzésem elvégzését lehetővé tették a Magyar Tudományos Akadémia Kémiai Kutatóközpontjában.
- Megköszönöm Dr. Vereczkey Lászlónak, hogy a doktori munkámat a Farmakobiokémiai Osztályon végezhettem, munkámat nélkülözhetetlen tanácsaival segítette.
- Köszönetemet fejezem ki az MTA KK Biomolekuláris Kémiai Intézet Farmakobiokémiai Osztály dolgozóinak, az általuk nyújtott támogatásért, különös tekintettel Grényi Imrénének a gondos és segítő munkájáért.
- Dr. Gráf Lászlónak az ELTE TTK, Biológia Doktori Iskola, Szerkezeti Biokémia Program vezetőjének hálásan köszönöm támogatását és segítőkészségét valamint azt, hogy problémáimmal bármikor fordulhattam hozzá, mindig talált megfelelő megoldást.
- Az elvégzett vizsgálatokért és az ebből származó értékes eredményekért köszönetet szeretnék mondani együttműködő partnereinknek, név szerint Damjana Rozmannak (Szlovénia, Ljubljana, Ljubljana Egyetem), Jean-Marc Pascussinak (Franciaország, Montpellier, INSERM), Urs A. Meyernek és Tamási Violának (Svájc, Basel, BIOZENTRUM) valamint Russell A. Proughnak (Egyesült Államok, Louisville, Louisvillai Egyetem).
- Végül, de nem utolsósorban, köszönöm férjemnek és családomnak végtelen türelmüket és a nyugodt hátteret, melyet mindig biztosítottak számomra a munkám végzése és a disszertáció megírása során.

10 Irodalomjegyzék

- Allolio B. és Arlt W. (2002): DHEA treatment: myth or reality?, *TRENDS in Endocrinology & Metabolism*, **13**, 288-294.
- Arlt W., Justl H. G., Callies F., Reincke M., Hübler D., Oettel M., Ernst M., Schulte H. M. és Allolio B. (1998): Oral dehydroepiandrosterone for adrenal androgen replacement: pharmacokinetics and peripheral conversion to androgens and estrogens in young healthy females after dexamethasone suppression., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 1928-1934.
- Arlt W., Haas J., Callies F., Reincke M., Hübler D., Oettel M., Ernst M., Schulte H. M. és Allolio B. (1999): Biotransformation of oral dehydroepiandrosterone in elderly men: significant increase in circulating estrogens., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **84**, 2170-2176.
- Baba T., Mimura J., Gradin K., Kuroiwa A., Watanabe T., Matsuda Y., Inazawa J., Sogawa K. és Fujii-Kuriyama Y. (2001): Structure and expression of the Ah receptor repressor gene., *J. Biol. Chem.*, **276**, 33101-33110.
- Banihmad A., Leng X., Burris T. P., Tsai S. Y., Tsai M. J. és O'Malley B. W. (1995): The tau 4 activation domain of the thyroid hormone receptor is required for release of a putative corepressor(s) necessary for transcriptional silencing., *Mol. Cell Biol.*, **15**, 76-86.
- Baulieu E. E. és Robel P. (1998): Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 4089-4091.
- Baulieu E. E., Thomas G., Legrain S., Lahlou N., Roger M., Debuire B., Faucounau V., Girard L., Hervy M.-P., Latour F., Leaud M.-C., Mokrane A., Ferrandi H. P., Trivalle C., Lacharri  re O., Nouveau S., Rakoto-Arison B., Souberbielle J.-C., Raison J., Le Bouc Y., Raynaud A., Girerd X., Forette F. (2000): Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: Contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue., *PNAs*, **97**, 4279-4284.
- Bayliss K. M. és Skett P. (1996): Isolation and culture of human hepatocytes., *Human Cell Culture Protocols*, Jones G. E. ed., Humana Press, Totowa, N.J., pp 369-390.
- Benoit G., Malewicz M., Perlmann T. (2004): Digging deep into the pockets of orphan nuclear receptors: insights from structural studies., *Trends Cell Biol.*, **14**, 369-376.
- Berry M. N., Edwards A. M., Barritt G. J., Grivell M. B., Halls H. J., Gannon B. J. és Friend D. S. (1991): Initial determination of cell quality., *Isolated hepatocytes*, Elsevier, Amsterdam, pp 45-47.
- Bird C. E., Masters V. és Clark A. V. (1984): Dehydroepiandrosterone sulfate: kinetics of metabolism in normal young men and women., *Clin. Invest. Med.*, **7**, 119-122.
- Black S. M., Harikrishna J. A., Szklarz G. D. és Miller W. L. (1994): The mitochondrial environment is required for activity of the cholesterol side-chain cleavage enzyme, cytochrome P450_{sc}., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 7247-7251.
- Bohan A. és Boyer J. L. (2002): Mechanisms of hepatic transport of drugs: implications for cholestatic drug reactions., *Semin. Liver Dis.*, **22**, 123-136.
- Bourguet W., Germain P. és Gronemeyer H. (2000): Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications., *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**, 381-388.
- Bose H. S., Lingappa V. L. és Miller W. L. (2002): Rapid regulation of steroidogenesis by mitochondrial protein import., *Nature*, **417**, 87-91.
- Brake P. B., Zhang L. és Jefcoate C. R. (1998): Aryl hydrocarbon receptor regulation of cytochrome P4501B1 in rat mammary fibroblasts: evidence for transcriptional repression by glucocorticoids., *Mol. Pharmacol.*, **54**, 825-833.
- Burke M. D., Thompson S., Weaver R. J., Wolf C. R. és Mayer R. T. (1994): Cytochrome P450 specificities alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver., *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 923-936.
- Burstein S. és Dorfman R. I. (1963): Determination of mammalian steroid sulfatase with 7 alpha-H3-3beta-hydroxyandrost-5-en-17-one sulfate., *J. Biol. Chem.*, **238**, 1656-1660.
- Chen J. D. (2000): Steroid/nuclear receptor coactivators., *Vitam. Horm.*, **58**, 391-448.
- Coleman D. L., Leiter E. H. és Schwizer R. W. (1982): Therapeutic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in diabetic mice., *Diabetes*, **31**, 830-833.
- Conney A. H. (1982): Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture., *Cancer Res.*, **42**, 4875-4917.
- Degtyarenko K. N. és Archakov A. I. (1993): Molecular evolution of P450 superfamily and P450-containing monooxygenase systems., *FEBS Letters*, **332**, 1-8.
- Delage-Mourroux R., Martini P. G., Choi I., Kraichely D. M., Hoeksema J. és Katzenellenbogen B. S. (2000): Analysis of estrogen receptor interaction with a repressor of estrogen receptor activity (REA)

- and the regulation of estrogen receptor transcriptional activity by REA., *J. Biol. Chem.*, **275**, 35848-35856.
- Dislerath L. M., Reilly P. E. B., Martin M. V., Davis G. G., Wilkinson G. R. és Guengerich F. P. (1985): Purification and characterization of the human liver cytochromes P-450 involved in debrisoquine 4-hydroxylation and phenacetin O-deethylation, two prototypes for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism., *J. Biol. Chem.*, **260**, 9057-9067.
- Dogra S. C., Whitelaw M. L. és May B. K. (1998): Transcriptional activation of cytochrome P450 genes by different classes of chemical inducers., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **25**, 1-9.
- Ferguson S. S., Chen Y., Negishi M. és Goldstein J. A. (2002/1): Identification of a constitutive androstane receptor (CAR) binding site in the promoter region of CYP2C19., *Drug Metab. Rev.*, **34**, Suppl. 1., 111.
- Ferguson S. S., LeCluyse E. L., Negishi M. és Goldstein J. A. (2002/3): Regulation of human CYP2C9 by the constitutive androstane receptor: discovery of a new distal binding site., *Mol. Pharmacol.*, **62**, 737-746.
- Ferrini J. B., Ourlin J. C., Pichard L., Fabre G. és Maurel P. (1998): Human hepatocyte culture., Cytochrome P450 Protocols, Phillips I. R. és Shephard E. A. ed., Humana Press, Totowa, N. J., pp 341-352.
- Fitzpatrick J. L., Ripp S. L., Smith N. B., Pierce W. M. Jr. és Prough R. A. (2001): Metabolism of DHEA by cytochromes P450 in rat and human liver microsomal fractions., *Arch. Biochem. and Biophys.*, **389**, 278-287.
- Forman B. M., Tzamelis I., Choi H. S., Chen J., Simha D., Seol W., Evans R. M. és Moor D. D. (1998): Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta., *Nature*, **395**, 612-615.
- Fukunaga B. N., Probst M. R., Reisz-Porszasz S. és Hankinson O. (1995): Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor., *J. Biol. Chem.*, **270**, 29270-29278.
- Frausto da Silva J. J. R. és Williams R. J. P. (1991): The biological chemistry of the elements., Clarendon Press, Oxford.
- Frenkel R. A., Slaughter C. A., Orth K., Moomaw C. R., Hicks S. H., Snyder J. M., Bennet M., Prough R. A., Putnam R. S. és Milewich L. (1990): Peroxisome proliferation and induction of peroxisomal enzymes in mouse and rat liver by dehydroepiandrosterone feeding., *J. Steroid Biochem.*, **35**, 333-342.
- Garfinkel D. (1958): Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions., *Archives of Biochem. and Biophysics*, **77**, 493-509.
- Geller D. H., Auchus R. J., Mendonca B. B. és Miller W. L. (1997): The genetic and functional basis of isolated 17,20 lyase deficiency., *Nat. Genet.*, **17**, 201-205.
- Gerbal-Chaloin S., Pascussi J. M., Pichard-Garcia L., Daujat M., Waechter F., Fabre J. M., Carrère N. és Maurel P. (2001): Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture., *Drug Metab. Disp.*, **29**, 242-251.
- Gerbal-Chaloin S., Daujat M., Pascussi J. M., Pichard-Garcia L., Vilarem M. J. és Maurel P. (2002): Transcriptional regulation of CYP2C9 gene. Role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor., *J. Biol. Chem.*, **277**, 209-217.
- Germain P., Staels B., Dacquet C., Spedding M. és Laudet V. (2006): Overview of nomenclature of nuclear receptors., *Pharmacol. Rev.*, **58**, 685-704.
- Ghayee H. K. és Auchus R. J. (2007): Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis., *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, **4**, 289-300.
- Giguere V., Hollenberg S. M., Rosenfeld M. G. és Evans R. M. (1986): Functional domains of the human glucocorticoid receptor., *Cell*, **46**, 645-652.
- Gonzalez F. J., Ueno T., Umeno M., Song B. J., Veech R. L. és Gelboin H. V. (1991): Microsomal ethanol oxidizing system: transcriptional and posttranslational regulation of cytochrome P450, CYP2E1., *Alcohol Suppl.*, **1**, 97-101.
- Goodwin B., Hodgson E. és Liddle C. (1999): The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module., *Mol. Pharmacol.*, **56**, 1329-1339.
- Goodwin B., Moore L. B., Stoltz C. M., McKee D. D. és Klierer S. A. (2001): Regulation of the human CYP2B6 gene by the nuclear pregnane X receptor., *Mol. Pharmacol.*, **60**, 427-431.
- Gorman N., Walton H. S., Sinclair J. F. és Sinclair P. R. (1998): CYP1A-catalyzed uroporphyrinogen oxidation in hepatic microsomes from non-mammalian vertebrates (chick and duck embryos, scup and alligator). *Comp. Biochemistry and Physiology*, **121C**, 405-412.
- Groves J. T. (1997): The importance of being selective., *Nature*, **389**, 329-330.
- Guengerich F. P., Martin M. V., Beaune P. H., Kremers P., Wolff T. és Waxman D. J. (1986): Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism., *J. Biol. Chem.*, **261**, 5051-5060.

- Guengerich F. P. (1997): Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species., *Chemico-Biological Interactions*, **106**, 161-182.
- Hakkola J., Pasanen M., Hukkanen J., Pelkonen O., Maenpaa J., Edwards R. J., Boobis A. R. és Raunio H. (1996): Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 forms in human full-term placenta., *Biochem. Pharm.*, **51**, 403-411.
- Hakkola J., Pelkonen O., Pasanen M. és Raunio H. (1998): Xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 enzymes in the human feto-placental unit: role in intrauterine toxicity., *Critical Rev. in Tox.*, **28**, 35-72.
- Handschin C. és Meyer U. A. (2003): Induction of drug metabolism: The role of nuclear receptors., *Pharmacol. Rev.*, **55**, 649-673.
- Hankinson O. (1995): The aryl hydrocarbon receptor complex., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **35**, 307-340.
- Hanukoglu I. (1992): Steroidogenic enzymes: structure, function and role in regulation of steroid hormone biosynthesis., *J. of Steroid Biochem. and Mol. Biol.*, **43**, 779-804.
- Heery D. M., Kalkhoven E., Hoare S. és Parker M. G. (1997): A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors., *Nature*, **387**, 733-736.
- Hellmold H., Rylander T., Magnusson M., Reihner E., Warner M. és Gustafsson J.-A. (1998): Characterization of cytochrome P450 enzymes in human breast tissue for reduction mammaplasties., *J. of Clinical Endocrinol. and Metab.*, **83**, 886-895.
- Heyn H., White R. B. és Stevens J. C. (1996): Catalytic role of cytochrome P4502B6 in the N-demethylation of S-mephenytoin., *Drug Metab. Dispos.*, **24**, 948-954.
- Honkakoski P., Moore R., Gynther J. és Negishi M. (1996): Characterization of phenobarbital-inducible mouse Cyp2b10 gene transcription in primary hepatocytes., *J. Biol. Chem.*, **271**, 9746-9753.
- Honkakoski P. és Negishi M. (2000): Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors., *Biochem. J.*, **347**, 321-337.
- Ikonen T., Palvimo J. J. és Janne O. A. (1997): Interaction between the amino- and carboxyl-terminal regions of the rat androgen receptor modulates transcriptional activity and is influenced by nuclear receptor coactivators., *J. Biol. Chem.*, **272**, 29821-29828.
- Jakoby W. B. (1994): Detoxication: Conjugation and hydrolysis, The Liver: Biology and Pathobiology, Arias I. M., Boyer J. L., Fausto N., Jakoby W. B., Schachter D. A. és Shafritz D. A. ed., Raven Press, New York, NY., pp 429-442.
- Joannard F., Galisteo M., Corcos L., Guillouzo A. és Lagadic-Gossman D. (2000): Regulation of phenobarbital-induction of CYP2B and CYP3A genes in rat cultured hepatocytes: involvement of several serine/threonine protein kinases and phosphatases., *Cell Biol. Toxicol.*, **16**, 325-337.
- Jones S. A., Moore L. B., Shenk J. L., Wisely G. B., Hamilton G. A., McKee D. D., Tomkinson N. C. O., LeCluyse E. L., Lambert M. H., Willson T. M., Klier S. A. és Moore J. T. (2000): The pregnane X receptor : a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution., *Mol. Endocrinol.*, **14**, 27-39.
- Juchau M. R. (1990): Substrate specificities and functions of the P450 cytochromes., *Life Sciences*, **47**, 2385-2394.
- Kalmijn S., Launer L. J., Stolk R. P., de Jong F. H., Pols H. A., Hofman A., Breteler M. M. és Lamberts S. W. (1998): A prospective study on cortisol, dehydroepiandrosterone sulfate, and cognitive function in the elderly., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 3487-3492.
- Kawamoto T., Sueyoshi T., Zelko I., Moore R., Washburn K. és Negishi M. (1999): Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene., *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 6318-6322.
- Kawano H., Yause H., Kitagawa A., Hirai N., Yoshida T., Soejima H., Miyamoto S., Nakano M. és Ogawa H. (2003): Dehydroepiandrosterone supplementation improves endothelial function and insulin sensitivity in men., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **88**, 3190-3195.
- Klingenberg M. (1958): Pigments of rat liver microsomes., *Archives of Biochem. and Biophysics*, **75**, 376-386.
- Kobayashi A., Sogawa K. és Fujii-Kuriyama Y. (1996): Cooperative interaction between AhR, Arnt and Sp1 for the drug-inducible expression of CYP1A1 gene., *J. Biol. Chem.*, **271**, 12310-12316.
- Kronbach T., Mathys D., Umeno M., Gonzalez F. J. és Meyer U. (1989): Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450III₄., *Mol. Pharmacol.*, **36**, 89-96.
- Krust A., Green S., Argos p., Kumar V., Walter P., Bornert J. M. és Chambon P. (1986): The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.*, **5**, 891-897.
- Kupfer D. (1980): Endogenous substrates of mono-oxygenases: fatty acids and prostaglandins., *Pharmacol. and Therap.*, **11**, 469-496.

- Labrie F., Belanger A., Simard J., Van L. és Labrie C. (1995): DHEA and peripheral androgen and estrogen formation: intracrinology., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **774**, 16-28.
- Lardy H., Partridge B., Kneer N. és Wei Y. (1995): Ergosteroids: induction of thermogenic enzymes in liver of rats treated with steroids derived from dehydroepiandrosterone., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 6617-6619.
- LeCluyse E., Madan A., Hamilton G., Carroll K., DeHaan R. és Parkinson A. (2000): Expression and regulation of cytochrome P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes., *J. Biochem. Mol. Tox.*, **14**, 177-188.
- Ledirac N. de Sousa G., Fontaine F., Agouridas C., Gugenheim J., Lorenzon G. és Rahmani R. (2000): Effects of macrolide antibiotics on CYP3A expression in human and rat hepatocytes: interspecies differences in response to troleandomycin., *Drug Metab. Dispos.*, **28**, 1391-1393.
- Lewis D. F. V. (1996): Cytochromes P450: Structure, Function and Mechanism., Taylor & Francis, London.
- Lewis D. F. V. (1998): The CYP2 family: models, mutants and interactions., *Xenobiotica*, **28**, 617-661.
- Lewis D. F. V. és Hlavica P. (2000): Interactions between redox partners in various cytochrome P450 systems: functional and structural aspects., *Biochim. et Biophysica Acta*, **1460**, 353-374.
- Lewis D. F. V. és Lee-Robichaud P. (1998): Molecular modelling of steroidogenic cytochromes P450 from families CYP11, CYP17, CYP19 és CYP21 based on the CYP102 crystal structure., *J. of Steroid Biochem. and Molecular Biol.*, **66**, 217-233.
- Lieber C. S. (1997): Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role., *Physiol. Rev.*, **77**, 517-544.
- Lin D., Sugawara T., Strauss J. F., Clark B. J., Stocco D. M., Saenger P., Rogol A. és Miller W. L. (1995): Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis., *Science*, **267**, 1828-1831.
- Linder M. W. és Prough R. A. (1993): Developmental aspects of glucocorticoid regulation of polycyclic aromatic hydrocarbon inducible enzymes in rat liver., *Arch. Biochem. Biophys.*, **302**, 92-102.
- Linder M. W., Falkner K. C., Srinivasan G., Hines R. N. és Prough R. A. (1999): Role of canonical glucocorticoid responsive elements in modulating expression of genes regulated by the arylhydrocarbon receptor., *Drug Metab. Rev.*, **31**, 247-271.
- Lowry O.H., Rosebrough N. J., Farr A. L. és Randall R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Maglich J. D., Parks D. J., Moore L. B., Collins J. L., Goodwin B., Billin A. N., Stoltz C. A., Kliewer S. A., Lambert M. H., Willson T. M. és Moore J. T. (2003): Identification of a novel human constitutive androstane receptor (CAR) agonist and its use in the identification of CAR target genes., *J. Biol. Chem.*, **278**, 17277-17283.
- Malik S. és Roeder R. G. (2000): Transcriptional regulation through mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells., *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 277-283.
- Mathis J. M., Prough R. A., Hines R. N., Bresnick E. és Simpson E. R. (1986/1): Regulation of cytochrome P-450c by glucocorticoids and polycyclic aromatic hydrocarbons in cultured fetal rat hepatocytes., *Arch. Biochem. Biophys.*, **246**, 439-448.
- Mathis J. M., Prough R. A. és Simpson E. R. (1986/2): Synergistic induction of monooxygenase activity by glucocorticoids and polycyclic aromatic hydrocarbons in human fetal hepatocytes in primary monolayer culture., *Arch. Biochem. Biophys.*, **246**, 650-661.
- Mathis J. M., Houser W. H., Bresnick E., Cidlowski J. A., Hines R. N., Prough R. A. és Simpson E. R. (1989): Glucocorticoid regulation of the rat cytochrome P450c (P450IA1) gene: receptor binding within intron I., *Arch. Biochem. Biophys.*, **269**, 93-105.
- Matsushita N., Sogawa K., Ema M., Yashida A. és Fujii-Kuriyama Y. (1993): A factor binding to the xenobiotic responsive element (XRE) of P-450IA1 gene consists of at least two helix-loop-helix proteins, Ah receptor and Arnt., *J. Biol. Chem.*, **268**, 21002-21006.
- Michael Miller K. K., Cai J., Ripp S. L., Pierce W. M., Rushmore T. H. és Prough R. A. (2004): Stereo- and regioselectivity account for the diversity of dehydroepiandrosterone (DHEA) metabolites produced by liver microsomal cytochromes P450., *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 305-313.
- Miller W. L. (2002): Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA., *Mol. and Cellular Endocrinol.*, **198**, 7-14.
- Mimura J. és Fujii-Kuriyama Y. (2003): Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD., *Biochim. Biophys. Acta*, **1619**, 263-268.
- Miners J. O. és Birkett D. J. (1996): Use of tolbutamide as a substrate probe for human hepatic cytochrome P450 2C9., *Methods Enzymol.*, **272**, 139-145.
- Monostory K. és Vereczkey L. (1996): In vitro-in vivo correlation of CYP1A induction., *Exp. Toxic. Pathol.*, **48**, (Suppl. II), 291-294.

- Moore L. B., Parks D. J., Jones S. A., Bledsoe R. K., Consler T. G., Stimmel J. B., Goodwin B., Liddle C., Blanchard S. G., Willson T. M., Collins J. L. és Kliewer S. A. (2000): Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands., *J. of Biol. Chem.*, **275**, 15122-15127.
- Muller M. (2000): Transcriptional control of hepatocanalicular transporter gene expression., *Semin. Liver Dis.*, **20**, 323-337.
- Nebert D. W. (1991): Proposed role of drug-metabolizing enzymes: regulation of steady state levels of the ligands that effect growth, homeostasis, differentiation and neuroendocrine functions., *Mol. Endocrinol.*, **5**, 1203-1214.
- Nebert D. W. és Gonzalez F. J. (1987): P450 genes: structure, evolution and regulation., *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 945-993.
- Nebert D. W. és Russell D. W. (2002): Clinical importance of the cytochromes P450., *Lancet*, **360**, 1155-1162.
- Nelson D. R. (1998): Metazoan cytochrome P450 evolution., *Comp. Biochemistry and Physiology*, **121C**, 15-22.
- Nelson D. R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J. J., Feyereisen R., Waxman D. J., Waterman M. R., Gotoh O., Coon M. J., Estabrook R. W., Gunsalus I. C. és Nebert D. W. (1996): P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession, numbers and nomenclature., *Pharmacogenetics*, **6**, 1-42.
- Okey A. B. (1990): Enzyme induction in the cytochrome P-450 system., *Pharmacol. Ther.*, **45**, 241-298.
- Okita R. T. és Masters B. S. S. (1992): Biotransformations: the cytochromes P450., Textbook of Biochemistry, Devlin T. M. ed., Wiley-Liss, New York, pp 981-999.
- Orentreich N., Brind J. L., Rizer R. L. és Vogelmann J. H. (1984): Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **59**, 551-555.
- Ortiz de Montellano P. R. (1995): Cytochrome P450, 2nd edition, Plenum, New York.
- Otsuka J. (1970): One interpretation of the thermal equilibrium between high-spin and low-spin states in ferrihemoproteins., *Biochim. et Biophysica Acta*, **214**, 233-235.
- Park Y., Li H. és Kemper B. (1996): Phenobarbital induction mediated by a distal CYP2B2 sequence in rat liver transiently transfected in situ., *J. Biol. Chem.*, **271**, 23725-23728.
- Parker C. R., Mixon R. L., Brissie R. M. és Grizzle W. E. (1997): Aging alters zonation in the adrenal cortex of men., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **82**, 3898-3901.
- Parker L., Eugene J., Farber D., Lifrak E., Lai M. és Juler G. (1985): Dissociation of adrenal androgen and cortisol levels in acute stress., *Horm. Metab. Res.*, **17**, 209-212.
- Pascussi J.-M., Drocourt L., Gerbal-Chaloin S., Fabre J.-M., Maurel P. és Vilarem M.-J. (2001): Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes., *Eur. J. Biochem.*, **268**, 6346-6357.
- Pascussi J.-M., Busson-Le Coniat M., Maurel P. és Vilarem M. J. (2003/1): Transcriptional analysis of the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (NR1I3) gene promoter: identification of a distal glucocorticoid response element., *Mol. Endocrinol.*, **17**, 42-55.
- Pascussi J.-M., Gerbal-Chaloin S., Drocourt L., Maurel P. és Vilarem M. J. (2003/2): The expression of CYP2B6 , CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors., *Biochim. Biophys. Acta*, **1619**, 243-253.
- Peters J. M., Zhou Y.-C., Ram P. A., Lee S. S. T., Gonzalez F. J. és Waxman D. J. (1996): Peroxisome proliferators-activated receptor α required for gene induction by dehydroepiandrosterone-3 β -sulfate., *Mol. Pharmacol.*, **50**, 67-74.
- Pinot F., Benveniste I., Salaun J.-P., Loreau O., Noel J.-P., Schreiber L. és Durst F. (1999): Production *in vitro* by the cytochrome P450 CYP94A1 of major cutin monomers and potential messengers in plant-pathogen interactions: enantioselectivity studies., *Biochemical Journal*, **342**, 27-32.
- Porter T. D. és Coon M. J. (1991): Cytochrome P450: multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms., *J. of Biological Chem.*, **266**, 13469-13472.
- Prough R. A., Lei X. D., Xiao G. H., Wu H. Q., Geoghegan T. E. és Webb S. J. (1995): Regulation of cytochromes P450 by DHEA and its anticarcinogenic action., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **774**, 187-199.
- Prough R. A., Webb S. J., Wu H.-G., Lapenson D. P. és Waxman D. J. (1994): Induction of microsomal and peroxisomal enzymes by dehydroepiandrosterone and its metabolite in rats., *Cancer Res.*, **54**, 2878-2886.
- Prough R. A., Linder M. W., Pinaire J. A., Xiao G.-H. és Falkner K. C. (1996): Hormonal regulation of hepatic enzymes involved in foreign compound metabolism., *FASEB J.*, **10**, 1369-1377.
- Quattrochi L. C. és Guzelian P. S. (2001): Cyp3a regulation: from pharmacology to nuclear receptors., *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 615-622.

- Rao M. S., Subbarao V., Yeldandi A. V. és Reddy J. K. (1992): Hepatocarcinogenicity of dehydroepiandrosterone in the rat., *Cancer Res.*, **52**, 2977-2979.
- Ravaglia G., Forti P., Maioli F., Boschi F., Bernardi M., Pratelli L., Pizzoferrato A. és Gasbarrini G. (1996): The relationship of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) to endocrine-metabolic parameters and function status in the oldest-old. Results from an Italian study on healthy free-living over-ninety-year-olds., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **81**, 1173-1178.
- Reiter E. O., Fuldauer V. G. és Root A. W. (1977): Secretion of the adrenal androgen, dehydroepiandrosterone sulfate, during normal infancy, childhood, and adolescence, in sick infants, and in children with endocrinologic abnormalities., *J. Pediatr.*, **90**, 766-770.
- Rendic S. és DiCarlo F. J. (1997): Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers and inhibitors., *Drug Metab. Reviews*, **29**, 413-580.
- Reyes H., Reisz-Porszasz S. és Hankinson O. (1992): Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor., *Science*, **256**, 1193-1195.
- Ripp S. L., Fitzpatrick J. L., Peters J. M. és Prough R. A. (2002): Induction of CYP3A expression by dehydroepiandrosterone : involvement of the pregnane X receptor., *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 570-575.
- Ripp S. L., Falkner K. C., Pendleton M. L., Tamasi V. és Prough R. A. (2003): Regulation of CYP2C11 by dehydroepiandrosterone and peroxisome proliferators: identification of the negative regulatory region of the gene., *Mol. Pharmacol.*, **64**, 113-122.
- Roberts B. J. és Whitelaw M. L. (1999): Degradation of the basic helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim homology domain dioxin receptor via the ubiquitin/proteasome pathway., *J. Biol. Chem.*, **274**, 36351-36356.
- Robinson B., Michael K. K., Ripp S. L., Winters S. J. és Prough R. A. (2003): Glucocorticoids inhibit interconversion of 7-hydroxy and 7-oxo metabolites of dehydroepiandrosterone: a role for 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases?, *Arch. Biochem. Biophys.*, **412**, 251-258.
- Roeder R. G. (1996): The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II., *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 327-335.
- Roymans D., van Looveren C., Leone A., Parker J. B., McMillan M., Johnson M. D., Koganti A., Gilissen R., Silber P., Mannens G. és Meuldermans W. (2004): Determination of cytochrome P450 1A2 and cytochrome P450 3A4 induction in cryopreserved human hepatocytes., *Biochem. Pharmacol.*, **67**, 427-437.
- Schenkman J. B. és Griem H. (1993): Cytochrome P450, Springer-Verlag, Berlin.
- Schwartz A. G. (1979): Inhibition of spontaneous breast cancer formation in female C3H(Avy/a) mice by long-term treatment with dehydroepiandrosterone., *Cancer Res.*, **39**, 1129-1132.
- Sherratt A. J., Banet D. E., Linder M. W. és Prough R. A. (1989): Potentiation of 3-methylcholanthrene induction of rat hepatic cytochrome P450IA1 by dexamethasone in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **249**, 667-672.
- Sherratt A. J., Banet D. E. és Prough R. A. (1990): Glucocorticoid regulation of polycyclic aromatic hydrocarbon induction of cytochrome P450IA1, glutathione S-transferases, and NAD(P)H:quinone oxidoreductase in cultured fetal rat hepatocytes., *Mol. Pharmacol.*, **37**, 198-205.
- Silver G., Reid L. M. és Krauter K. S. (1990): Dexamethasone-mediated regulation of 3-methylcholanthrene-induced cytochrome P-450d mRNA accumulation in primary rat hepatocyte cultures., *J. Biol. Chem.*, **265**, 3134-3138.
- Singleton D. W., Lei X.-D., Webb S. J., Prough R. A. és Geoghegan T. E. (1999): Cytochrome P-450 mRNAs are modulated by dehydroepiandrosterone, nafenopin and triiodothyronine., *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 193-200.
- Sizonenko P. C. és Paunier L. (1975): Hormonal changes in puberty III: correlation of plasma dehydroepiandrosterone, testosterone, FSH and LH with stages of puberty and bone age in normal boys and girls and in patients wit Addison's disease or hypogonadism or with premature or late adrenarche., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **41**, 894-904.
- Sonnier M. és Cresteil T. (1998): Delayed ontogenesis of CYP1A2 in the human liver., *Eur. J. Biochem.*, **251**, 893-898.
- Soucek P. és Gut I. (1992): Cytochromes P450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms., *Xenobiotica*, **22**, 83-103.
- Spencer N. F. L., Poynter M. E., Hennebold J. D., Mu H.-H. és Daynes R. A. (1995): Does DHEAS restore immune competence in aged animals through its capacity to function as a natural modulator of peroxisome activities?, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **774**, 200-216.
- Srivastava P. K., Yun C.-H., Beaune P. H., Ged C. és Guengerich F. P. (1991): Separation of human liver microsomal tolbutamide hydroxylase and (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase cytochrome P-450 enzymes., *Mol. Pharmacol.*, **40**, 69-79.
- Stieger B. és Meier P. J. (1998): Bile acid and xenobiotic transporters in liver., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**, 462-467.

- Stoltz C. és Anderson A. (1999): Positive regulation of the rat CYP2B2 phenobarbital response unit by the nuclear receptor hexamer half-site-nuclear factor 1 complex., *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 1073-1076.
- Sueyoshi T. Kawamoto T., Zelko I., Honkakoski P. és Negishi M. (1999): The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene., *J. Biol. Chem.*, **274**, 6043-6046.
- Suzuki H. és Sugiyama Y. (2000): Transport of drugs across the hepatic sinusoidal membrane: sinusoidal drug influx and efflux in the liver., *Semin. Liver Dis.*, **20**, 251-263.
- Takemori S. és Kominami S. (1984): The role of cytochromes P450 in adrenal steroidogenesis., *Trends in Biological Sciences*, **9**, 393-396.
- Torchia J., Glass C. és Rosenfeld M. G. (1998): Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**, 373-383.
- Töke L. és Szeghy L. (1992): Gyógyszerkémia I-II., Tankönyvkiadó, Budapest, 865-882.
- Trottier E., Belzil A., Stoltz C. és Anderson A. (1995): Localization of a phenobarbital-responsive element (PBRE) in the 5'-flanking region of the rat CYP2B2 gene., *Gene*, **158**, 263-268.
- Tzamelis I., Pissios P., Schuetz E. G. és Moore D. D. (2000): The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropropylidyoxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR., *Mol. And Cell. Biol.*, **20**, 2951-2958.
- Umesono K. és Evans R. M. (1989): Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors., *Cell*, **57**, 1139-1146.
- van der Hoeven T. A. és Coon M. J. (1974): Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes., *J. Biol. Chem.*, **249**, 6302-6310.
- Vo N. és Goodman R. H. (2001): CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation., *J. Biol. Chem.*, **276**, 13505-13508.
- Wang H., Faucette S., Sueyoshi T., Moore R., Ferguson S., Negishi M. és LeCluyse E. L. (2003): A novel distal enhancer module regulated by pregnane X receptor/constitutive androstane receptor is essential for the maximal induction of CYP2B6 gene expression., *J. Biol. Chem.*, **278**, 14146-14152.
- Wang H és Negishi M. (2003): Transcriptional regulation of cytochrome p450 2B genes by nuclear receptors., *Curr. Drug Metab.*, **4**, 515-525.
- Waterman M. R. (1992): Cytochrome P450: cellular distribution and structural considerations., *Curr. Opinion in Structural Biology*, **2**, 384-387.
- Watkins R. E., Wisely G. B., Moore L. B., Collins J. L., Lambert M. H., Williams S. P., Willson T. M., Kliewer S. A. és Redinbo M. R. (2001): The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity., *Science*, **292**, 2329-2333.
- Watkins R. E., Maglich J. M., Moore L. B., Wisely G. B., Noble S. M., Davis-Searles P. R., Lambert M. H., Kliewer S. A. és Redinbo M. R. (2003): 2.1 Å crystal structure of human PXR in complex with the St. John's wort compound hyperforin., *Biochemistry*, **42**, 1430-1438.
- Waxman D. J. (1999): P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: Central role of nuclear receptors CAR, PXR and PPAR., *Arch. of Biochem. and Biophys.*, **369**, 11-23.
- Webb S. J., Geoghegan T. E., Prough R. A. és Michael Miller K. K. (2006): The biological actions of dehydroepiandrosterone involves multiple receptors., *Drug Metab. Rev.*, **38**, 89-116.
- Webb S. J., Xiao G.-H., Geoghegan T. E. és Prough R. A. (1996): Regulation of CYP4A expression in rat by dehydroepiandrosterone and thyroid hormone., *Mol. Pharmacol.*, **49**, 276-287.
- Wei P., Zhang J., Egan-Hafley M., Liang S. és Moore D. D. (2000): The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism., *Nature*, **407**, 920-923.
- White J. H., Fernandes I., Mader S. és Yang X. J. (2004): Corepressor recruitment by agonist-bound nuclear receptors., *Vitam. Horm.*, **68**, 123-143.
- Williams J. A., Martin F. L., Muir G. H., Hewer A., Grover P. L. és Philips D. H. (2000): Metabolic activation of carcinogens and expression of various cytochromes P450 in human prostate tissue., *Carcinogenesis*, **21**, 1683-1689.
- Williams S. P. és Sigler P. B. (1998): Atomic structure of progesterone complexed with its receptor., *Nature*, **393**, 392-396.
- Wu H.-Q., Masset-Brown J., Tweedie D. J., Milewich L., Frenkel R. A., Martin-Wixtrom C., Estabrook R. W. és Prough R. A. (1989): Induction of microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase and cytochrome P-450IA1 (P-450_{IA1}) by dehydroepiandrosterone in rats: a possible peroxisomal proliferator., *Cancer Res.*, **49**, 2337-2343.
- Xiao G.-H., Pinaire J.A., Rodrigues A. D. és Prough R. A. (1995): Regulation of the Ah gene battery via Ah receptor-dependent and independent processes in cultured adult rat hepatocytes., *Drug Metab. Dispos.*, **23**, 642-650.

Ziegler D. M. (1994): Detoxication: oxidation and reduction., The liver: Biology and Pathobiology, Arias I. M., Boyer J. L., Fausto N., Jakoby W. B., Schachter D. A. és Shafritz D. A. ed., Raven Press, New York, NY., pp 415-427.